

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES
SUR
L'ANGINE A BACILLES FUSIFORMES

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de 2^e classe, Professeur agrégé au Val-de-Grâce.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce)

I

Le bacille de Löffler n'est pas le seul microbe capable de provoquer des exsudats pseudo-membraneux à la surface des muqueuses et de la peau. On sait qu'un assez grand nombre de bactéries, qui habitent normalement la cavité buccale peuvent également déterminer, sur la muqueuse du pharynx, des lésions plus ou moins analogues à celles de la diphtérie. Enfin on a constaté chez les animaux des affections pseudo-membraneuses qui relèvent de microbes n'ayant aucun rapport avec le bacille de Löffler.

L'affection dont je vais parler, et que j'ai eu l'occasion d'observer dès l'année 1893, mérite d'être rapprochée des angines pseudo-membraneuses pouvant simuler la diphtérie. Elle est caractérisée, en effet, surtout à son début, par un exsudat couenneux blanchâtre ou grisâtre, développé à la surface d'une amygdale. Elle s'accompagne d'adénite, parfois assez prononcée, de dysphagie, de fièvre, et réalise ainsi les principaux symptômes de l'angine diphtérique. Aussi est-il permis de penser qu'elle est, d'habitude, confondue avec cette dernière affection. Elle s'en

separe, cependant, par certaines particularités cliniques spéciales, et, de plus, elle paraît être sous la dépendance d'un bacille caractéristique, facile à distinguer du bacille de Löffler.

La première mention de cette nouvelle forme d'angine et de son agent pathogène a paru, dans ces *Annales*¹, à propos d'un travail sur la Pourriture d'Hôpital : il existe, en effet, une grande analogie entre le bacille de cette dernière affection et celui de l'angine diphtéroïde. J'ai fourni la description clinique de cette angine dans deux communications à la *Société Médicale des Hôpitaux*². Depuis lors, un certain nombre d'auteurs ont publié, sur le même sujet, des travaux confirmatifs ; on en trouvera la mention dans l'index bibliographique placé à la fin de ce mémoire.

Avant d'aborder l'étude bactériologique de cette affection, il y a lieu de signaler brièvement les caractères cliniques qu'elle présente.

Au début de la maladie, l'amygdale est recouverte d'un placard pseudo-membraneux blanchâtre ou grisâtre peu épais, pouvant être détaché par le raclage. Enlevée, la fausse membrane s'est reproduite le lendemain : elle repose très souvent, dès ce moment, sur une surface légèrement érodée. Vers le troisième ou le quatrième jour, la pseudo-membrane est plus épaisse, mais plus molle, bien qu'elle ne se laisse pas dissocier aisément dans l'eau.

A ce moment, l'affection peut suivre deux marches différentes. Dans sa forme la moins fréquente, la fausse membrane est cohérente. Elle repose sur une exulcération très superficielle de la muqueuse et ne tarde pas à se détacher par l'un de ses bords, et à disparaître, déglutie ou rejetée par l'expusion. Le lendemain, on trouve, à la même place, une nouvelle fausse membrane plus mince, qui disparaît, à son tour, au bout de quelques jours. La fièvre dure deux ou trois jours et n'est jamais très élevée. Les ganglions sous-maxillaires sont tuméfiés.

Dans la deuxième forme de l'affection, il se développe d'une manière précoce, sous la fausse membrane, une sorte d'ulcère

1. H. Vincent. Sur l'étiol. et sur les lésions anatomo-pathol. de la Pourriture d'Hôpital. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, p. 492, 1898.

2. H. Vincent. Sur une forme particulière d'angine diphtéroïde (angine à bacilles fusiformes). *Soc. Médic. des Hôp.* 17 mars 1898.

Id. Nouvelles recherches sur l'angine à bac. fusiformes. *Ibid.* 12 janvier 1899.

plus ou moins profond. L'excès d'humidité est mou, grisâtre ou gris-jaunâtre, d'apparence crayeuse et d'odeur fétide. Sous cet excès d'humidité, la surface de l'ulcération est tomenteuse et saigne facilement. La muqueuse pharyngée avoisinante est rouge et œdématisée. La dysphagie est, parfois, très vive ; plus tard elle devient presque nulle. La fausse membrane peut envahir l'amygdale opposée et la luette. Cette variété s'accompagne d'adénite sous-maxillaire parfois prononcée. La fièvre ne dépasse guère 38°-39°, et dure quelques jours, pendant lesquels le malade accuse de la courbature, de l'inappétence et un état saburrel des premières voies. L'amygdale se nettoie vers le huitième ou le dixième jour, en moyenne, et l'ulcération ne tarde pas à se cicatriser sous l'influence d'un traitement antiseptique local. Dans certains cas, l'affection est plus tenace ; elle peut durer plusieurs semaines sans fièvre et sans autre trouble fonctionnel qu'une dysphagie plus ou moins marquée. Nicolle a observé un cas dans lequel la durée a été de deux mois.

Il existe donc, au point de vue clinique, deux formes principales de la maladie, l'une, *diphéroïde*, dans laquelle la fausse membrane recouvre une exulcération insignifiante ou légère : cette variété est la moins commune et simule entièrement la diphtérie. La seconde forme est primitivement diphéroïde et secondairement *ulcéro-membraneuse*. Ces deux variétés cliniques de l'angine correspondent, ainsi qu'on va l'établir, à un processus bactériologique un peu différent : le bacille pathogène est pur dans le premier cas, tandis que, dans le second, il est associé à une autre bactérie.

Je n'ai, personnellement, observé cette affection que chez l'adulte. Toutefois, elle est assez fréquente chez les jeunes enfants et peut présenter chez eux une marche très grave¹, alors que son pronostic est, au contraire, bénin chez l'adulte.

Le diagnostic de cette angine se fait surtout par l'examen microscopique.

II

Examen bactériologique de l'excès d'humidité. — Si l'on préleve un peu de l'excès d'humidité développé à la surface du pharynx, et qu'on l'exa-

1. M. le Dr Richardière m'a dit en avoir observé des cas assez nombreux chez les enfants isolés dans le pavillon des suspects du service de la diphtérie, à l'hôpital Saint-Antoine.

mine au microscope après coloration par la thionine ou par le liquide de Ziehl dilué, on constate la présence, en quantité parfois colossale, d'un bacille d'aspect très particulier. Ses dimensions sont assez variables, les plus courts sont de 6 à 8 μ ; la longueur habituelle est de 10 à 12 μ . Ce bacille est donc plus volumineux que le bacille de Löffler. Il est, parfois, très long et peut même devenir filamenteux. Il reste, néanmoins, facilement reconnaissable grâce à sa forme : sa portion moyenne est, en effet, légèrement renflée, tandis que ses deux extrémités sont nettement amincies et effilées. De plus, ce bacille est tantôt rectiligne, tantôt infléchi en virgule, principalement dans ses formes jeunes et courtes. Ces bacilles sont généralement isolés; on en trouve cependant quelques-uns disposés bout à bout. Ils n'affectent jamais les groupements caractéristiques du bacille de la diphtérie.

On les trouve en quantité extrêmement abondante, surtout au début de l'angine; ils sont tantôt dispersés en semis uniforme, dans le champ de la préparation, tantôt assemblés, en nombre véritablement extraordinaire, sous forme d'amas irréguliers, parfois de faisceaux composés d'éléments divergents, presque radiés.

Ce bacille présente assez souvent des *formes d'involution* : on constate, dans sa continuité, des vacuoles incolores, à peu près arrondies, mais inégales entre elles, au nombre de une à trois, quatre ou davantage selon la longueur du microbe. Lorsque cette portion claire est unique et qu'elle existe au milieu du bacille, celui-ci ressemble à une navette. Ces espaces clairs sont apparents dans les préparations traitées par un colorant peu énergique. La coloration par le liquide de Ziehl non dilué est trop intense et dissimule ces vacuoles. Celles-ci ne correspondent pas à des spores. En effet, elles sont de volume inégal et ne se teintent pas par les procédés qui colorent les spores. On rencontre surtout ces bacilles vacuolaires dans les cas déjà soumis à un traitement antiseptique. Il existe, du reste, d'autres formes d'involution dans lesquelles le bacille affecte des formes géantes, est granuleux et se colore mal. Certains bacilles ont des contours irréguliers; leur protoplasme est échancré. Parfois, le centre du bacille est considérablement renflé, incolore, et les contours de ce renflement ampullaire sont simplement marqués par un fin linéament.

L'aspect ordinaire du bacille est, cependant, celui qui a été signalé en premier lieu : extrémités amincies et portion centrale renflée en fuseau. En raison de cet aspect, on peut donc l'appeler *bacille fusiforme* (fig. 1).

Le bacille se colore bien par les couleurs d'aniline. Le colorant de choix est la thionine phéniquée, ou bien le liquide de Ziehl dilué au quart. La liqueur iodo-iodurée ne produit pas, sur

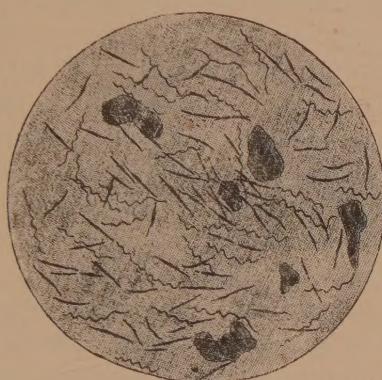


Fig. 1. — Frottis de fausse membrane. Bacilles fusiformes avec association spirillaire.

ce bacille, de réaction bleue ni brun-acajou ; par contre le chloro-iodure de zinc donne au corps bacillaire une teinte brunâtre (Sabrazès).

Indépendamment de l'aspect tout particulier et des dimensions du bacille fusiforme, il est un caractère qui permettra de le différencier d'autres bacilles qu'on peut être exposé à rencontrer dans les préparations, notamment du bacille de Löffler : le bacille fusiforme ne se laisse pas colorer par la méthode de Gram ou de Weigert. La double coloration par le procédé de Gram et par la fuchsine rendra donc des services dans les cas qui pourraient paraître douteux.

Il importe de faire remarquer que les bacilles fusiformes présentent leur maximum d'abondance dans les premiers jours de la maladie. Un peu plus tard, surtout dans la forme ulcéreuse de l'angine, les innombrables bactéries qui pullulent dans

la bouche envahissent à leur tour la fausse membrane et se mélangent au bacille, alors qu'au début celui-ci se montre à peu près seul. Quelle que soit, du reste, la période, ancienne ou récente, de l'affection, c'est seulement à la surface que se multiplient les microbes étrangers. Le bacille est abondant et pur dans la partie profonde de la fausse membrane.

Lorsqu'on examine au microscope, et à l'état frais, un peu de la fausse membrane dissociée dans une goutte d'eau, on constate que le bacille fusiforme est immobile ou paraît animé de mouvements douteux.

Les essais de culture de ce bacille soit à l'air, soit dans le vide, ont, jusqu'ici, toujours échoué. Des parcelles de fausse membrane, ensemencées avec soin sur le sérum animal ou le sérum humain, ou bien à la surface de la gélose glycérinée, dans le lait, le liquide d'ascite, la gélatine additionnée d'urine alcalinisée, etc., n'ont donné lieu à aucun développement de ce microorganisme. Les cultures ont fourni, en nombre parfois insignifiant, quelques colonies soit du staphylocoque, soit du streptocoque, soit du *B. Coli*, ce dernier dans un cas sur quinze. Raoult et Thiry ont isolé, de la même manière, quelques colonies du *B. Coli* ou du pneumocoque. C. Nicolle a eu de très rares colonies de cocci. Les cultures ne m'ont jamais donné le bacille de Löffler ou le *b. pseudo-diphthérique*. La présence de quelques colonies étrangères dans les milieux ensemencés (qui est régulièrement constatée aussi dans les cultures de membranes diphtériques) ne saurait surprendre. Elle s'explique par la constance habituelle de ces microorganismes, et même du pneumocoque (Griffon et Besançon) dans la cavité buccale. L'examen direct des coupes de la fausse membrane dans l'angine à bacilles fusiformes montre, du reste, que les microbes adventices y sont très rares.

Il y a lieu, cependant, de faire une exception pour la forme *ulcéro-membraneuse* de l'angine. L'examen bactériologique montre, en effet, que dans cette variété, qui est la plus fréquente, le bacille est associé à un spirille que l'on peut trouver en proportion parfois très abondante (fig. 1). Alors que la forme pure de l'angine est caractérisée par une production diphtéroïde à la surface de l'amygdale, sans perte de substance du tissu sous-jacent, dans la forme associée la lésion s'étend, au contraire,

en profondeur, et amène la nécrose avec ulcération de la surface de l'amygdale. Cette ulcération apparaît dès le 3^e ou le 4^e jour, parfois dès le second. Sur 18 cas d'angine à bacilles fusiformes que j'ai observés, j'ai constaté 3 cas de forme pure, *diphéroïde*, et 15 cas avec association spirillaire (forme primitivement diphéroïde et ultérieurement *ulcéro-membraneuse*).

Étant donnée l'abondance du spirille dans certains cas, il est vraisemblable que sa symbiose avec le bac. fusiforme favorise la végétation de ce dernier à la surface du pharynx. Il y a donc lieu de dire quelques mots de ce spirille.

Celui-ci est fort ténu. Il se colore moins bien que le bacille fusiforme. Il ne prend pas le Gram. Le nombre des spirilles est variable. Tantôt on les trouve en quantité considérable ; tantôt, au contraire, ils sont rares. Dans la profondeur de la fausse membrane, ils sont beaucoup moins nombreux qu'à sa surface : c'est un fait également constaté par Nicolle.

A l'état frais, tantôt on les trouve immobiles ou peu mobiles (Raoult et Thiry), tantôt, au contraire, ils sont doués de mouvements rapides ; Nicolle a constaté que « leur corps flexible, élastique, se tend et se détend comme un ressort à boudin » et il en fait de véritables spirochaetes.

Je n'ai pas réussi à cultiver ces microbes. Ils paraissent, du reste, très analogues aux spirilles qui existent normalement dans la salive et le tartre dentaire, et qui ne sont pas cultivables.

Il était intéressant de rechercher si, de même que le spirille ou spirochète qui lui est si souvent associé, le bacille fusiforme se rencontre également dans la bouche des sujets sains. A cet effet, j'ai examiné l'enduit lingual, le tartre dentaire et l'enduit pharyngé de 18 sujets exempts de toute angine. Dans 14 cas, j'ai pu constater, par l'examen microscopique, quelques bacilles facilement reconnaissables à leur portion centrale renflée, à leurs extrémités amincies, à leur forme parfois infléchie et à leur non coloration par la méthode de Gram.

Ce bacille, qui paraît donc être un hôte très fréquent de la cavité buccale, peut du reste encore se retrouver, quoique en proportion toujours très faible, dans les diverses espèces d'angines à fausses membranes. En explorant, en effet, avec soin les préparations faites avec les frottis d'angine diphérique, il est bien rare qu'on ne trouve pas ça et là, dans le champ de la

préparation, au milieu des bacilles de la diptétrie, quelques exemplaires du bacille fusiforme. J'ai fait la même constatation dans l'angine à streptocoques et dans un cas d'angine colibacillaire. J'ai pu constater également quelques bacilles fusiformes au milieu d'innombrables microcoques développés à la surface d'exulcérations résultant d'une angine herpétique. Il est aisé de comprendre qu'à la faveur des lésions — quelle qu'en soit la nature — de la muqueuse pharyngée, la bacille fusiforme végète, au même titre que les autres bactéries, saprophytes ou pathogènes, qui existent dans la bouche. Certains faits me porteraient à penser que ce microbe peut pulluler abondamment à la surface des ulcérations syphilitiques de la bouche et du pharynx. Freyche a observé un cas de ce genre¹.

Il est probable que le même bacille peut intervenir dans certaines suppurations voisines de la cavité buccale. Lichtwitz et Sabrazès ont constaté que, dans un cas d'angine à bacilles fusiformes, ce bacille était en très grande abondance dans le pus concret et fétide d'un empyème du sinus maxillaire. De même, dans un abcès péri-laryngien, il était associé au streptocoque et au pneumocoque.

Le bacille fusiforme est-il pathogène pour les animaux ? Malgré des essais nombreux, je n'ai pu réussir à déterminer des lésions bien notables en inoculant l'exsudat diptéroïde sur la conjonctive ou à la surface de la muqueuse buccale ou vaginale des animaux. L'injection sous-cutanée a provoqué, dans un cas, un petit abcès contenant de rares microcoques. Raoul et Thiry ont échoué également dans leurs essais d'inoculation.

Examen de la fausse membrane. — La lésion produite par le bacille fusiforme, seul ou associé à divers microbes favorisants, tels que le spirille, est essentiellement un processus de nécrose. Des coupes de la fausse membrane dans un cas d'angine à bacille pur ont été pratiquées. Après collage, les coupes ont été colorées pendant quinze minutes à l'aide de la thionine phéniquée, puis traitées pendant quelques secondes par la glycérine acétique à 1/200, lavées soigneusement à l'eau, puis montées

1. FREYCHE. *Etudes sur l'angine diptéroïde et ulcér. à bac fusiformes de Vincent. Thèse de Toulouse, 1899, p. 49.* D'autres bactéries, telles que le streptocoque, le *Bac. Coli* peuvent, du reste, jouer un rôle dans la formation des fausses membranes à la surface des syphilides diptéroïdes (Bouloche, Hudelo et Bourges).

dans le baume d'après les procédés habituels. La double coloration a été obtenue par l'éosine en solution aqueuse. La solution alcoolique d'aurantia peut être employée à la place de la glycérine acétique, et constitue un excellent moyen de différenciation.

Dans les préparations ainsi colorées, on voit, à un faible grossissement, trois zones bien distinctes. La plus superficielle est constituée par la portion nécrosée de la fausse membrane. Elle est d'une teinte bleu verdâtre très pâle, et pauvre en éléments cellulaires. C'est à peine si l'on voit là quelques noyaux libres, à contours irréguliers, ayant pris un peu mieux la coloration. Le picrocarmin colore cette couche en jaune pâle.

La zone intermédiaire (*b*), dans les coupes traitées par la thionine, contraste avec la précédente par sa coloration bleue très vive. Elle est constituée, en effet, tout entière, par des amas considérables de bacilles fusiformes étroitement tassés, formant une sorte de haie compacte et sinuuse d'où partent perpendiculairement de petits prolongements qui s'engagent dans l'épaisseur de la muqueuse.

La couche la plus profonde de la fausse membrane (*c*) est plus riche en éléments cellulaires. Néanmoins les noyaux de ces cellules sont altérés, leurs bords sont déchiquetés. Ils ne présentent aucune trace de multiplication. Leur nucléole a disparu ; leur chromatine s'est, en partie, diffusée dans le protoplasma cellulaire. Dans les préparations traitées par la méthode de Weigert, on aperçoit, dans cette zone, une structure aréolaire fibrineuse très nette, analogue à celle de la fausse membrane diptérique. Il n'est pas sans intérêt de constater que des microbes pathogènes si différents, le bacille de la diptérie et le bacille fusiforme, déterminent, à la surface de la muqueuse pharyngée, des altérations histologiques semblables.

A un grossissement suffisant, on voit que les bacilles sont répartis d'une manière assez inégale dans l'épaisseur de la fausse membrane. A la surface de celle-ci, ils sont assez abondants, mais mélangés à un grand nombre de microbes étrangers et, en particulier, de cocci (*fig. 2, a*). C'est dans le district sous-jacent que la prolifération du bacille est la plus active. Les bacilles y forment, en effet, un banc tellement touffu qu'il est impossible de les discerner isolément (*b*). Dans la couche la plus profonde (*c*), ils deviennent, au contraire, moins nombreux et sont facile-

ment reconnaissables. En cette région, ils sont à l'état pur. Aucun microbe ne leur est associé, sauf dans certaines coupes où l'on voit de petits nids de microcoques accompagnant les trainées bacillaires.

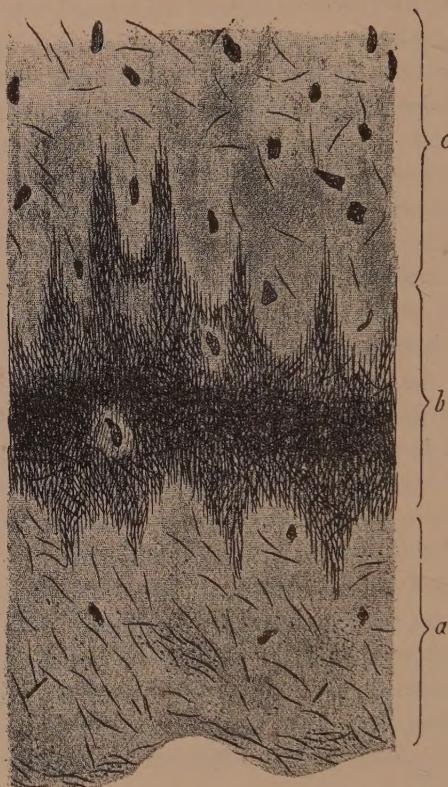


Fig. 2. — Angine à bacilles fusiformes. Forme pure. Coupe de la fausse membrane.

La double coloration, par le procédé de Gram et la fuchsine, montre, du reste, à la surface de la coupe, les microbes étrangers colorés en violet, à côté des bacilles fusiformes qui ont pris la coloration rouge. Dans la profondeur, soit au niveau de la couche active de prolifération des bacilles, soit dans le territoire sous-jacent, les bacilles apparaissent seuls, groupés en trainées

compactes ou éparpillés au milieu des tissus mal colorés et partiellement nécrosés.

III

En terminant l'étude de l'angine à bacilles fusiformes, il paraît utile de faire ressortir les analogies qui existent, au double point de vue clinique et bactériologique, entre cette maladie et une autre affection heureusement à peu près disparue, aujourd'hui, du domaine de la chirurgie : je veux parler de la diphtérie des plaies ou pourriture d'hôpital. L'une et l'autre de ces deux affections est caractérisée par une production néomembraneuse. Remarquons cependant que l'angine diphtéroïde s'accompagne presque toujours d'adénite, alors que, dans la diphtérie des plaies, les ganglions lymphatiques correspondant à la lésion ne sont pas tuméfiés. Sauf cette différence clinique, l'analogie des deux affections se poursuit jusque dans l'aspect des deux bacilles qui présentent à peu près les mêmes dimensions, la même forme renflée légèrement au centre avec extrémités amincies ; qui se décolorent également par la méthode de Gram ; qui ne sont cultivables ni l'un ni l'autre ; enfin qui, dans les deux affections, se montrent très fréquemment associés à un fin spirille¹.

S'agit-il, dès lors, d'une seule et même affection localisée ici, au niveau du pharynx, là, à la surface d'une plaie accidentelle ou chirurgicale ? On ne saurait l'affirmer, attendu que, jusqu'à présent, malgré de nombreuses tentatives, les deux bacilles n'ont pu être cultivés. Cet élément important de comparaison nous fait donc absolument défaut. Mais il est plausible de penser que ces deux microbes sont probablement très voisins.

1. H. Vincent, *loc cit.*

BIBLIOGRAPHIE

H. VINCENT. Sur l'étiol. et sur les lésions anatomo-pathologiques de la pourriture d'hôpital. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, p. 492, 189.6)

H. VINCENT. Sur une forme particulière d'angine diphtéroïde (angine à bacilles fusiformes. (*Société Médic. des Hôp.*, 17 mars 1898.)

Id. Nouvelles recherches sur l'angine diphtéroïde à bac. fusiformes. (*Ibid.*, 12 janv. 1899.)

- BERNHEIM. Ueber einen bakteriol. Befund bei Stomatitis ulcerosa. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, nos 5, 6, p. 177, 11 févr. 1898.)
- G. H. LEMOINE. Angine ulcéro-membr. à bac. fusiformes et spirilles. (*Soc. méd. des Hôp.*, 24 mars 1898.)
- RAOULT et THIRY. Amygdalites ulcéro-membr. avec spirilles et b. fusiformes de Vincent. (*Congrès de laryng.* Paris, mai 1898.)
- DOPTER. Angine à bac. fusiformes de V. (*Presse Médic.*, 10 août 1898.)
- BERNHEIM et POSPISCHILL. Etude clin. et bact. de la stomatite ulcéreuse. (*Jahr. f. Kinderheilk.*, 1898, *Bd. 46.*)
- ABEL. Bactériol. de la stomat. et de l'ang. ulcéreuse. (*Centralbl. f. Bakter. u. Parasitenk.*, 15 juill. 1898.)
- DE STOECKLIN. Contrib. à l'étiol. des angines ulcéro-membr. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 4 nov. 1898.)
- RISPAL. Ang. diphtéroïde à b. fusiformes et spirilles. (*Soc. de méd. de Toulouse*, 11 nov. 1898.)
- SACQUÉPÉE. Cinq cas d'ang. à spirilles et b. fusiformes de Vincent. (*Bull. et mémoires de la Soc. méd. des Hôp.*, 19 janv. 1899, p. 41.)
- CH. NICOLLE. Ang. ulcéro-membr. à bac. fusif. et spirilles (angine de Vincent). (*Mémoires et trav. du Labor. de Bactér. de l'Ecole de Méd. de Rouen*. Rouen, 1899.)
- LICHTWITZ et SABRAZÈS. Bac. fusiformes de V. dans un cas d'amygdalite ulcé. et dans deux cas de suppur. péribac. (*Arch. intern. de Laryngol.*, XII, no 2, 1899, p. 134.)
- G. SCHNEIDER. Angine à bacilles fusiformes de Vincent, *Presse médic.* 17 juin 1899.
- J. FREYCHE. Etudes sur l'Angine diphtérique et ulcéreuse de Vincent, *Thèse de Toulouse*, 1899.

NOTE SUR UN BACILLE DES VOIES RESPIRATOIRES

ET SES RAPPORTS AVEC LE BACILLE DE PFEIFFER

PAR M. LE DR ELMASSIAN

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Au cours de recherches sur l'étiologie de la coqueluche, mon attention a été attirée sur un petit bacille fin, présentant avec le bacille de l'influenza, décrit par Pfeiffer, les plus grandes analogies et n'en différant que par sa culture sur les milieux au sérum (gélose-ascite, gélose-sérum, etc.), en l'absence d'hémoglobine. Pfeiffer¹ considère la présence d'hémoglobine comme indispensable au développement des colonies du bacille de l'influenza, et les nombreuses et rigoureuses expériences faites par lui pour le démontrer ne semblent laisser aucun doute à cet égard. Quant au « pseudo-influenza bacillus » dont la différenciation repose sur l'aspect morphologique, Pfeiffer est un peu moins explicite sur ses conditions de culture; il laisse entendre que le « pseudo-influenza bacillus » ne pousse que sur les milieux sanguins, mais il ne dit pas formellement qu'il ait spécialement recherché s'il se développe sur les milieux au sérum et sans hémoglobine, renvoyant d'ailleurs le lecteur à des recherches ultérieures qui n'ont pas encore paru.

Sur les 32 cas de coqueluche dont j'ai pu examiner l'expectoration bronchique, j'ai réussi 8 fois à isoler le petit bacille en question en culture pure, mais je m'empresse d'ajouter que je l'ai retrouvé dans des cas de bronchite aiguë, en dehors de la coqueluche, chez des adultes et chez des enfants, et que je ne songe pas à lui attribuer, jusqu'à plus ample informé, un rôle spécifique dans l'étiologie de la coqueluche ou de telle autre infection bronchique aiguë.

N'étant pas à même de poursuivre actuellement l'étude systé-

1. PFEIFFER, *Zeitschrift f. Hyg.*, 1893. V. 13, p. 356.

matique des infections bronchiques infantiles ou autres, je désire seulement attirer l'attention sur ce bacille et sur les confusions auxquelles il peut donner lieu. En effet, depuis le mémoire de Pfeiffer, la plupart des auteurs qui ont recherché le bacille de l'influenza ont considéré comme tel tout bacille fin, ne prenant pas le Gram, et formant sur gélose sanguine de petites colonies transparentes et si fines que la loupe est le plus souvent nécessaire pour les reconnaître. Or, le bacille que nous étudions ne peut être différencié morphologiquement du bacille de l'influenza, et il donne sur gélose sanguine des colonies absolument identiques à celles du bacille de Pfeiffer. Comme lui il ne se développe pas sur les milieux ordinaires non additionnés de sang. Il ne s'en distingue donc que par le seul fait de son développement facile sur gélose-sérum sans hémoglobine. Ce caractère a-t-il l'importance absolue que Pfeiffer lui a attribué et suffit-il à lui seul à créer une différenciation? Pour trancher la question, il eût été nécessaire d'étudier parallèlement un certain nombre de races de bacille de Pfeiffer, isolés de cas d'influenza typiques.

L'épidémie d'infections broncho-pulmonaires qui a sévi à Paris cette année, et que les cliniciens désignent par le terme vague de grippe, semblait devoir fournir les matériaux nécessaires à cette étude. Nous avons pu étudier, dans de bonnes conditions, l'expectoration de 6 malades. Trois fois il nous a été impossible de déceler dans la sécrétion bronchique, tant par la culture que par l'examen microscopique, la présence du bacille de Pfeiffer ou de notre bacille.

Dans 3 cas observés dans une même famille, nous avons isolé, sur gélose sanguine comme d'ailleurs sur gélose sérum, un bacille qu'il nous a été impossible de différencier de celui que nous étudions et qui, repiqué de la gélose sanguine sur gélose sérum, a poussé aussi facilement sur l'un comme sur l'autre milieu. Par tous ses caractères, il correspond au bacille de Pfeiffer, avec cette différence qu'il peut se développer en l'absence d'hémoglobine. Or, c'est là le seul caractère qui différencie aussi le bacille que nous avons étudié du bacille de Pfeiffer.

Grâce à l'obligeance M. Dujardin-Beaumetz, nous avons pu étudier un bacille isolé par le Dr Meunier¹, dans une broncho-

1. MEUNIER, 10 cas de broncho-pneumonie due au bacille de Pfeiffer. *Archiv. gén. de méd.* Février et mars 1897.

pneumonie chez un enfant, et que cet auteur avait considéré comme étant du bacille de l'influenza de Pfeiffer. Ce bacille, conservé et cultivé sur gélose sanguine depuis deux ans, repiqué sur gélose sérum, a donné une culture en tous points semblable à celles de notre bacille, et tous ses caractères l'identifient complètement avec lui.

Le Dr Dujardin-Beaumetz réussit à prolonger considérablement la vitalité du bacille de l'influenza en l'ensemencant dans des sacs en collodion, qu'il mit ensuite inclus dans la cavité péritonéale de cobayes. Dans ces conditions, et malgré l'absence d'hémoglobine, le développement du bacille de Pfeiffer est considérable, et on le retrouve encore vivant plusieurs mois après l'ensemencement.

On le voit, la question semble fort complexe, et comme le contrôle expérimental sur les animaux n'est pas possible, puisque le bacille de Pfeiffer comme notre bacille n'est pas infectant pour les espèces animales autres que l'espèce humaine, l'observation clinique, complétée par l'investigation bactériologique, nous semble seule en état de dissiper ces obscurités.

La pathologie des voies respiratoires doit être dégagée des conceptions anatomiques et ramenée à la notion des infections. Mais il faut le reconnaître, le terrain est encore peu préparé et les difficultés sont nombreuses. Le nombre des mémoires publiés en ces dernières années sur la bactériologie de la coqueluche est très respectable, mais les résultats de ces recherches sont peu concordants, et il ne s'en dégage aucune indication précise. C'est que chaque auteur est préoccupé de voir, dans le microbe isolé par lui, le bacille spécifique de la coqueluche, alors que rien ne justifie pareille conclusion.

Nous décrirons donc, d'une manière aussi brève et aussi précise que possible, le petit bacille que nous avons si fréquemment isolé de la sécrétion bronchique d'enfants ou d'adultes atteints d'affections broncho-pulmonaires aiguës, et ne pouvant trancher la question à l'heure actuelle, nous nous abstiendrons de préjuger en aucune manière son rôle dans ces diverses inflammations.

Nos premiers examens ont donc porté sur la sécrétion bronchique d'enfants atteints de coqueluche. Après avoir lavé le crachat dans de l'eau stérile pour le débarrasser du mucus et

des microbes dont il a pu se charger pendant son trajet au travers de la bronche, nous en prélevons une partie pour l'examen microscopique, et une autre pour la culture.

Les préparations microscopiques, étalées et fixées suivant les procédés habituels, étaient colorées par la fuschine de Ziehl diluée et le bleu de méthylène phéniqué pendant des temps variables.

Dans toute une série de cas, chez des malades du pavillon de l'hôpital Troussseau, l'espèce microbienne qui nous avait semblé la plus constante, et qui pour cette raison avait fixé notre attention, était représentée par un petit bacille fin, siégeant le plus souvent en dehors des leucocytes, et formant parfois des amas irréguliers, rappelant ceux de la septicémie des souris ou du bacille de Weeks, de la conjonctivite aiguë contagieuse.

Ce bacille se colore assez difficilement : avec les solutions de fuchsine de Ziehl, étendues et chauffées à 60°, on arrive à le mettre en évidence, mais il ne prend jamais la couleur d'une manière très intense.

Néanmoins, nous avons rencontré des cas où, malgré une recherche attentive et l'examen d'un grand nombre de préparations, ce bacille fin faisait défaut. Ce fait, joint à la constatation du bacille dans d'autres infections bronchiques, nous avait d'ailleurs porté à écarter toute idée de relation étiologique entre ce bacille et la coqueluche.

Comme dimension moyenne, ce bacille se rapproche du bacille de Weeks. Il est un peu plus épais et présente souvent un très léger étranglement transversal et médian. En outre ses extrémités sont effilées ou arrondies, et ne paraissent jamais rectangulaire. Certains éléments sont nettement bacillaires, d'autres rappellent en beaucoup plus petit les formes allongées du bacille pneumonique. Ce petit bacille s'en distingue plus aisément par le fait qu'il se décolore par la méthode de Gram.

Pour l'étude de la sécrétion bronchique par la culture, nous avons procédé de la manière suivante. Nous avons pris de larges tubes de 3 à 4 centimètres de diamètre dans lesquels nous avons préparé le mélange de gélose avec une sérosité pathologique (sérosité de kyste ovarien, d'ascite ou d'épanchement pleural). Ces tubes étaient préparés suivant la méthode habituelle. Nous mettions tout d'abord 6 c. c. de gélose ordinaire à 20/0 de peptone

neutralisée. Nous stérilisions à l'autoclave : puis, pendant le refroidissement, lorsque la température de la gélose est comprise entre 70° et 50°, on introduit 3 c. c. de sérosité stérile. On opère le mélange par quelques mouvements imprimés aux tubes et on laisse la solidification se faire, en inclinant le tube pour avoir une grande surface. On s'assure de la stérilité en plaçant les tubes 24 à 48 heures à l'étuve avant de s'en servir. L'emploi des tubes nous a paru préférable à l'emploi de boîtes de Petri, car les chances de contamination par les microbes de l'air sont moins grandes, alors que la surface utilisable de gélose sérum est tout aussi considérable.

Voici maintenant comment nous obtenons l'isolement de notre bacille. Après avoir lavé les crachats suivant la méthode de Koch, et ainsi que nous l'avons dit plus haut, nous en prélevions une petite quantité avec la spatule de platine que nous promenions ensuite à la surface de 6, 8 ou 10 tubes sans reprendre de la sécrétion. Ces tubes sont placés à l'étuve, à 37°.

Après 24 heures, les 3 ou 4 premiers tubes sont si chargés de colonies diverses qu'il n'est pas possible de les utiliser, mais à partir du 4^e ou 5^e tube, le nombre des colonies apparentes devient très faible. Si l'on examine la surface de la gélose avec une loupe de 15 dioptries, on constate un nombre considérable de petites colonies circulaires, transparentes, faisant une très faible saillie, et presque imperceptibles à l'examen direct. Dans le cas où le bacille en question était abondant dans les sécrétions bronchiques, nous avons été souvent surpris de voir qu'à partir du 5^e tube aucun développement ne paraissait, à un premier examen, s'être produit, alors que l'examen à la loupe révélait des colonies confluentes et quasi pures du bacille en question. Dans tous les cas il était facile de faire un repiquage de colonies isolées à partir du 4^e, 5^e tube, et d'obtenir, par conséquent, des cultures pures.

Examинées au microscope, les colonies développées à la surface de la gélose-sérum affectent une forme régulièrement arrondie et faiblement convexe. Les contours sont assez nets, la colonie est incolore, transparente, et présente un aspect très faiblement granuleux. Ces colonies n'ont pas de noyaux et leur diamètre ne dépasse pas de 1/4 à 1/2 millimètre. Cependant, lorsqu'elles sont très éloignées les unes des autres, leur diamètre

peut atteindre le double après 2-3 jours de séjour à l'étuve. Étalée en frottis sur une lame et colorée par la fuchsine diluée, la colonie se montre constituée par un bacille semblable à celui que nous avons décrit, et les variations morphologiques, suivant l'âge de la culture, ne portent que sur la longueur, la coloration uniforme ou au contraire prédominante aux extrémités du bacille. Après un certain nombre de repiquages, il arrive que les bacilles, tout en conservant leur diamètre transversal, deviennent un peu plus allongés, mais sans jamais atteindre plus du double en longueur de la dimension primitive.

Le bacille qui nous occupe se cultive exclusivement sur les milieux additionnés de sérosités humaines ou animales. Dans le bouillon peptoné ordinaire, dans la gélatine, sur la gélose peptonée simple et sur les milieux végétaux, nous n'avons jamais vu se produire le moindre développement.

Par contre, si l'on additionne la gélose ou le bouillon peptoné ordinaire d'une sérosité pathologique humaine, ou encore de sérum de lapin ou de cobaye, on obtient une prolifération abondante. Le sérum de cheval, par contre, ne nous a pas paru se prêter à la culture de notre bacille.

Dans les milieux liquides (bouillon sérum), la culture ne devient apparente qu'après 48 heures d'étuve à 37°, et cependant après 24 heures déjà les bacilles sont très abondamment multipliés dans le liquide, ainsi que le prouve l'examen direct ou l'ensemencement sur milieu solide. Après 48 heures, on constate un trouble uniforme communiquant au liquide, lorsqu'on l'agit, un aspect moiré. Ce trouble augmente un peu les 3 premiers jours, puis il reste stationnaire, et insensiblement les microbes se déposent au fond du vase, tandis que le liquide s'éclairent.

La culture reste vivante pendant 8-10 jours si le ballon est maintenu à une température supérieure à 30°. Les cultures développées ne conservent que fort peu de temps leur vitalité à la température ordinaire, et il est le plus souvent impossible de repiquer une culture qui a séjourné 24 heures à la température du laboratoire. Le bacille est également peu résistant aux températures supérieures à 45°. A cette température de 45°, il résiste encore un quart d'heure ou vingt minutes, mais à 58° il est rapidement tué.

Pour le conserver et éviter des repiquages tous les 4 ou 5 jours

comme on est obligé de faire avec des cultures en surface sur gélose-sérum, le mieux est de l'ensemencer en piqûre dans de la gélose-sérum et de laisser les tubes à l'étuve. Le développement se produit surtout dans les couches superficielles de la gélose-sérum, et l'on peut faire des repiquages 15 jours ou même 3 semaines après l'ensemencement.

Nous avons inoculé notre bacille aux différentes espèces d'animaux de laboratoire (lapin, cobaye, pigeon, souris). L'inoculation intraveineuse de doses assez considérables de culture en milieu liquide ne provoque chez le lapin aucun phénomène morbide. Si la dose dépasse 10 c. c. il se produit parfois une cachexie lente, mais jamais on ne retrouve dans les humeurs ou les tissus de l'animal, le microbe inoculé. Le pigeon et la souris ne réagissent en aucune manière à l'inoculation.

Le jeune cobaye est le seul animal chez lequel nous ayons obtenu une réaction expérimentale, à la condition toutefois d'inoculer la culture dans la cavité péritonéale.

Si l'on injecte, dans le péritoire d'un cobaye de 200 grammes, 2 à 4 c. c. d'une culture en bouillon sérum de 48 heures, l'animal succombe le plus souvent en moins de 24 heures; l'abdomen est tendu, douloureux. L'animal reste immobile. Sa température s'élève rapidement de 4 à 5° dès la première heure qui suit l'injection. A l'autopsie, on constate une péritonite généralisée, caractérisée par une teinte rosée de la séreuse, et par la présence d'un exsudat séro-fibrineux plus ou moins abondant. Au niveau de la face convexe du foie, on voit souvent une exsudation abondante, formant un revêtement gris jaunâtre continu.

L'exsudat est constitué par des filaments de fibrine et par de nombreux leucocytes mono et polynucléaires. Les bacilles sont nettement multipliés et existent aussi bien entre les cellules que dans le protoplasma des phagocytes.

On observe également un exsudat séreux pleural et péricardique renfermant moins de leucocytes que l'exsudat péritonéal, et contenant quelques bacilles, mis en évidence par l'examen microscopique. On cultive facilement le bacille de l'exsudat péritonéal et de l'exsudat pleural, et l'ensemencement du sang du cœur donne le plus souvent des colonies assez nombreuses du bacille inoculé.

Il n'est pas possible de faire d'inoculation en série sans

recourir à la culture. L'xsudat péritonéal inoculé à un cobaye jeune ne provoque aucune réaction manifeste.

Cette péritonite expérimentale n'a rien de caractéristique. Elle ne diffère guère de celle qu'on provoque avec le bacille typhique, avec le vibron cholérique, le gonocoque, etc.

A ce point de vue encore, la différenciation n'est pas possible, car les expériences de Turner et Kolle, faites avec le bacille de l'influenza sur les jeunes cobayes, ont donné des résultats identiques, et l'on peut considérer cette péritonite expérimentale comme dépourvue de toute valeur de différenciation.

Disons en terminant que le bacille que nous venons de décrire n'a rien de commun avec ceux auxquels Ritter¹, Affanasiéff², Koplik³, Czaplewsky⁴, Zusch⁵, Livio Vincenzi⁶, W. Butter-milch⁷, etc., ont attribué un rôle étiologique dans la coqueluche. Tous ont décrit des bacilles qui se cultivent facilement sur les milieux ordinaires en prenant le Gram, et qui, par ces caractères mêmes, diffèrent complètement de notre bacille.

En somme, le point sur lequel nous voulons appeler l'attention des cliniciens et des bactériologistes est le suivant: nous avons isolé dans l'expectoration d'enfants ou d'adultes atteints de maladies différentes (coqueluche, tuberculose pulmonaire, pneumonie) un bacille en tous points identique à celui que nous avons rencontré dans 3 cas sur 6 d'infection bronchique grippale rentrant cliniquement dans le type influenza.

Le bacille isolé présente tous les caractères assignés par Pfeiffer au bacille de l'influenza, mais il se développe aussi bien sur les milieux au sérum (gélose-ascite ou gélose-sérum) que sur les milieux exsangues : par contre, jamais nous n'avons obtenu de développement sur la gélose peptonée ordinaire.

Dans les sécrétions bronchiques de ces différents malades, un fait est à remarquer, c'est que le bacille en question ne semble pas un hôte absolument constant, et que son abondance est très

1. RITTER. — *Berl. Klin. Woch.* 1892, p. 1276; *Idem.* 1876, n° 47, p. 1040-43, et n° 48, p. 1069-71.

2. AFFANASIEFF. — Saint-Pétersbourg. *Med. Woch.* 1887, n° 39-42.

3. KOPLIK. — *Cent. f. Bact.* 1897, Band. XXII p. 222.

4. CZAPLEWSKY et HEUSEL. — 1^{er} mémoire, *Centrab. f. Bact.* 1897, Band. XXII, p. 641 — 2^e mémoire, *Idem.* 1898, Band. XXIV, p. 865.

5. ZUSCH. — *Cent. f. Bact.* 1898, Band. XXIX, p. 721. — *Idem.* 1898, Band. XXIV, p. 769.

6. LIVIO VINCENZI. — *Deut. med. Woch.* 1898, n° 40, p. 631.

7. W. BUTTER-MILCH. — *Berl. Klin. Woch.* 1899, n° 17, p. 367.

variable. Tantôt il existe en si grand nombre qu'à l'examen microscopique on n'hésiterait pas à lui attribuer le rôle pathogène, tantôt au contraire on a peine à le reconnaître au milieu des autres espèces microbiennes, et la culture seule permet de rendre sa présence évidente.

S'agit-il d'un saprophyte pur des voies respiratoires ? S'agit-il au contraire d'un organisme semblable au pneumocoque et pouvant être tour à tour saprophyte ou pathogène ? Nous savons, en effet, que le pneumocoque peut persister à l'état saprophytique dans les cavités buccales ou nasales de l'homme sain, qu'il peut provoquer des infections pulmonaires aiguës et même des épidémies de bronchite, de méningite ou de conjonctivite. Entre le pneumocoque saprophyte et le pneumocoque des épidémies de méningite, le bactériologiste ne peut établir aucune distinction évidente et indiscutable, et tandis que l'expérimentation sur l'animal ne lui apporte au point de vue de la différenciation que des données insuffisantes, les effets que l'observation clinique permet de constater sont bien souvent très différents.

Nous pensons que le bacille de Pfeiffer, dont le rôle dans l'influenza n'est que très vraisemblable et ne peut être considéré comme prouvé, appartient à une espèce microbienne dont l'existence saprophytique sur les muqueuses des voies respiratoires et comparable à celle du pneumocoque. Ce microbe se multiplie et peut devenir pathogène au cours d'autres infections bronchopulmonaires (pneumonie, coqueluche, etc.) et ainsi s'expliqueraient les constatations que nous avons pu faire.

SUR LA PRÉSENCE D'AGGLUTININES SPÉCIFIQUES dans les cultures microbiennes¹.

Par M. le Dr E. MALVOZ.

Dans un précédent travail², j'ai montré que l'agglutination des microbes n'était pas une propriété spéciale des sérumspécifiques, comme on l'avait pensé d'abord, mais que ce phénomène pouvait être provoqué par des substances chimiques beaucoup moins complexes, au premier rang desquelles se plaçaient la formaline, le sublimé, des matières colorantes telles que la safranine et la vésuvine.

Depuis la publication de ce travail, la liste des substances, que j'ai reconnues comme douées de propriétés agglutinantes, s'est beaucoup allongée : je signalerai en particulier la fuchsine en solution aqueuse bien filtrée, et les acides acétique et lactique dilués³.

Pour étudier l'agglutination, je me sers maintenant, au lieu du bacille typhique, d'un microbe beaucoup plus facile à observer et qui est très sensible aux agglutinines, le premier vaccin du charbon. Il n'est pas difficile avec quelque habitude, en délayant une anse de culture sur gélose de 1^{er} vaccin dans un peu d'eau distillée, d'obtenir de belles émulsions montrant des bâtonnets, avec leur légère mobilité, bien isolés les uns des autres. On rejette les

1. Le présent travail a été adressé à la rédaction des *Annales* en février 1899. C'est à cause de l'encombrement de la publication qu'il n'a pu paraître plus tôt.

2. Sur l'agglutination des bacilles typhiques par des substances chimiques. *Annales Pasteur* 1897.

3. Nous avons été mis sur la voie de la découverte des propriétés agglutinantes très curieuses de l'acide acétique dilué par une circonstance bizarre, qui porte son enseignement au sujet des causes d'erreur en matière de séro-diagnostic. On nous avait envoyé du sang pour l'épreuve de Widal, et nous trouvions que son sérum agglutinait le bacille typhique même à 1 p. 5000! C'était, à n'en pas douter, une vraie fièvre typhoïde. Or, nous apprîmes qu'il s'agissait de sang normal. Après bien des questions et des recherches, il fut reconnu enfin que l'expéditeur avait rincé au vinaigre, pour le nettoyer, le petit tube où le sang avait été recueilli!

émulsions montrant par-ci par-là des paquets de bacilles ayant échappé à la dissociation.

C'est ce microbe atténué du charbon qui est particulièrement sensible à l'action de l'acide acétique dilué : tandis que le même acide concentré rapetisse simplement les bacilles sans les réunir en amas, l'acide produit de très belles agglutinations, même à des dilutions de 1 p. 2000 et davantage. L'acide lactique agit de même. On ne voit pas au microscope de coagulum englobant les microbes ; ceux-ci semblent englobés dans un précipité formé en dehors d'eux. Nous ignorons encore le mécanisme intime de l'agglutination, aussi bien par les sérum que par nos substances chimiques, et quelles sont les causes qui rapprochent les uns des autres des microbes primitivement séparés.

* * *

La présence de substances agglutinantes spécifiques dans le sang des sujets infectés est généralement attribuée à des réactions de l'organisme : sous l'influence des microbes ou de leurs produits, il y aurait, ou bien production en excès de substances déjà élaborées à l'état physiologique, ou bien sécrétion de produits nouveaux, doués de propriétés agglutinantes.

Mes recherches me semblent devoir faire envisager la question d'une autre façon : il n'est pas nécessaire, me paraît-il, d'invoquer l'existence de sécrétions normales ou pathologiques dues, soit à l'infection elle-même, soit aux processus cellulaires de l'immunisation, pour expliquer l'action agglutinante des sérum. On peut retrouver, dans les cultures mêmes des microbes, tout au moins en ce qui concerne le charbon, des agglutinines spécifiques : celles-ci, ajoutées à des émulsions neuves, y produisent des amas de bacilles, qui ne diffèrent pas de ceux obtenus au moyen du sérum.

On savait déjà que certains microbes, en proliférant dans les cultures liquides, ne restent pas isolés, mais se présentent en flocons plus ou moins volumineux : tel est le cas pour les microbes du charbon virulent, du reuguet, de la diphtérie etc. Les cultures du bacille typhique lui-même, en bouillon ordinaire, présentent assez souvent de petits amas microbiens. Ces faits sont bien connus de tous ceux qui s'occupent de séro-diagnostic, et on recommande notamment, pour l'épreuve de Widal, de se

servir de cultures en eau peptone (Courmont), qui montrent généralement des bacilles bien isolés.

Ces agglutinations spontanées sont appelées des *pseudo-amas*, et on les a toujours différenciées, je ne sais pourquoi, des groupements bacillaires produits par l'action des sérum.

Quoi qu'il en soit de ces distinctions, les faits suivants prouvent, me paraît-il, l'existence d'agglutinines spécifiques dans les cultures.

Prenons une émulsion de premier vaccin charbonneux préparée en broyant, dans un demi-centimètre cube d'eau distillée, une anse de culture sur gélose restée six jours à 22°. On dépose sur porte-objet une anse de l'émulsion, on s'assure que les bacilles sont mobiles et bien isolés les uns des autres. La préparation peut être abandonnée plusieurs heures en chambre humide, sans que des agglutinations se produisent entre les bacilles. L'addition d'eau ordinaire, d'eau salée à 1-3-5 0/0, laisse les microbes parfaitement isolés, même après plusieurs heures.

Mais si on mélange sur le porte-objet, à une anse d'émulsion, la même proportion de bouillon ordinaire (alcalin), on voit les bacilles perdre leur faible mobilité, puis se rapprocher, se souder en groupes composés de 3-5-10 bacilles.

Le résultat est le même si on emploie de la gélatine en feuille additionnée de 10 parties d'eau distillée : les préparations sont maintenues liquides à 37°; la gélatine se comporte donc comme le ferait du sérum spécifique dilué.

Enfin, le phénomène de l'agglutination devient très net si on se sert, non plus d'un bouillon vierge, mais d'un bouillon dans lequel a prolifié le bacille du charbon lui-même, et que l'on a débarrassé des microbes au moyen de l'appareil centrifugeur. On prend une anse de cette culture centrifugée, on s'assure qu'elle ne renferme pas de bacilles. On la mélange intimement sur porte-objet à une anse d'émulsion de vaccin, on abandonne en chambre humide. Bientôt, on voit apparaître au microscope des amas de 10-15-20 microbes et même davantage; à un moment donné, il reste peu de bacilles libres dans la préparation. Le sérum normal du cheval, qui est doué d'un certain pouvoir agglutinant, ne provoque pas d'amas plus considérables ni différents d'aspect des premiers.

Les cultures de charbon, qui m'ont donné l'agglutination la

plus nette, avaient été obtenues par M. Lambotte, mon assistant, en soumettant des bouillons ensemencés de *bacillus anthracis* à une agitation continue, au moyen de l'appareil Herman¹; particularité très curieuse, les liquides ainsi agités plusieurs jours deviennent, après quelques passages, d'une viscosité très grande, dont nous ne connaissons pas encore la raison. Non seulement les bacilles du vaccin, traités par une culture centrifugée de charbon, se groupent en amas, mais on distingue, dans les corps microbiens, ces sortes de vacuolisations qui s'observent souvent par l'addition des sérum spécifiques. On ne parvient pas à distinguer un coagulum ou un précipité englobant les bacilles.

Si, au lieu de vaccin charbonneux, on emploie une émulsion de *bacterium coli* ou de *b. typhosus*, on ne parvient pas à provoquer l'agglutination de ces microbes.

Dilué au quart, le liquide charbonneux agglutine encore, mais plus faiblement, les émulsions de vaccin.

On sait que le phénomène de l'agglutination peut être étudié d'une autre façon qu'en se servant d'émulsions microbiennes auxquelles on ajoute du sérum. Il est possible de faire l'observation à l'état *naissant*, en ajoutant à un milieu de culture liquide, en goutte pendante par exemple, une trace de sérum spécifique; on ensemence avec quelques microbes seulement, on abandonne à une température convenable, en même temps que des préparations témoins non additionnées de sérum. Dans ces conditions, on assiste à la pullulation microbienne accompagnée de l'agglutination, là où l'on a ajouté le sérum.

Ensemencons de la même façon du vaccin charbonneux, quelques microbes seulement, en goutte pendante: des préparations seront faites en eau peptone (peptone de Witte), d'autres en bouillon ordinaire, en gélatine nutritive (maintenue à 37°), et enfin en culture charbonneuse centrifugée. En eau peptone, la plupart des bacilles restent séparés les uns des autres, en se multipliant. Ce n'est qu'après un certain temps qu'ils se réunissent en petits amas; dans les autres milieux, au contraire, les préparations se présentent, après 24 à 36 heures, comme s'il s'agissait de milieux additionnés d'un peu de sérum spécifique: les bacilles sont groupés en flocons, surtout considérables dans

1. *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VII, n° 2.

les cultures en liquide charbonneux centrifugé. Il ne s'agissait nullement d'une prolifération de microbes du charbon, ayant échappé à la centrifugation : des préparations témoins faites avec le liquide sont restées stériles ; d'ailleurs, les caractères du premier vaccin étaient très reconnaissables.

Mais si on ensemence du *bacterium coli* dans une goutte pendante de liquide charbonneux, on voit aussi les bacilles proliférer en s'agglutinant. Où est, dans ce cas, la spécificité ? Celle-ci se manifeste si, au lieu d'employer la culture centrifugée de charbon telle quelle, on la dilue au dixième. Une goutte pendante de cette dilution, ensemencée de *b. coli*, ne montre pas de microbes en amas, tandis que le vaccin du charbon y prolifère en bacilles entortillés et agglutinés, comme dans une culture additionnée de sérum spécifique.

* * *

Il faut donc bien admettre que les cultures de charbon renferment, à un moment donné, des agglutinines spécifiques, dont on peut faire apparaître les propriétés *in vitro* dans des milieux neufs. C'est surtout le liquide, débarrassé des microbes, d'une culture agitée, qui se montre chargé de ces substances douées du pouvoir de provoquer l'agglutination. Mais pourquoi le phénomène se produit-il aussi, à un plus faible degré, il est vrai, en mélangeant des bacilles pris sur gélose et émulsionnés dans l'eau, à du bouillon neuf, à de la gélatine liquéfiée, à du sérum normal ? Il faut bien admettre que les bacilles apportent avec eux des produits, dont nous ne connaissons pas la nature, lesquels, en présence de certaines substances du bouillon, etc., amènent, soit la formation d'un coagulum englobant les microbes, soit une viscosité particulière des bâtonnets qui adhèrent ainsi les uns aux autres. On ne connaît pas bien le mécanisme de l'agglutination des microbes, comme des globules rouges, et ce travail n'a pas été fait pour résoudre cette question.

On remarquera que le bouillon, la gélatine liquéfiée, se comportent comme le sérum normal de certains animaux. Ne peut-on assimiler le phénomène à celui qui se produit après l'addition de fuchsine, par exemple ? J'ai obtenu de très beaux amas de bacilles en ajoutant de la fuchsine, en solution aqueuse bien filtrée, aux émulsions : des flocons rougeâtres de microbes

adhérents se déposent et, après un certain temps, le liquide s'éclaircit complètement en se décolorant. Un sérum spécifique provoque des précipitations du même genre. Dira-t-on que la fuchsine est *agglutinante*? N'est-ce pas, au contraire, cette substance colloïdale, en solution toujours incomplète, qui se coagule et est véritablement *agglutinée* autour des bacilles entraînés dans le précipité? N'y a-t-il pas, dans le bouillon, la gélatine, le sérum normal, des substances colloïdales qui, en présence de certains produits apportés avec les microbes, se précipitent en plus ou moins grande abondance? On peut penser, *a priori*, que les phénomènes d'agglutination, en englobant les microbes eux-mêmes, sont très contingents et très étroitement liés à une foule de facteurs, tels que la qualité et la quantité des sels dissous, etc. On comprend ainsi que certains sérumns normaux agglutinent beaucoup mieux que d'autres, et que des bacilles d'une espèce donnée soient plus sensibles au phénomène. Dans le mémoire qui suit, MM. Lambotte et Maréchal ont vu le sérum humain normal agglutiner le vaccin du charbon même à 1 p. 500, comme un véritable sérum spécifique!

Mais comment s'expliquer la propriété agglutinante si considérable du sérum des animaux immunisés? A notre avis, ce sont les inoculations répétées de produits microbiens qui surchargent le sang de ces mêmes substances qu'on retrouve dans les cultures, substances inconnues, mais qui, mises en présence des bacilles homologues, déterminent leur agglutination. Ces substances se condensent et se fixent peut-être dans le sérum. Un travail fait à notre laboratoire par M. Gengou et qu'on trouvera plus loin, sur l'agglutination dans le charbon inoculé au chien, a donné des résultats qui cadrent mal avec l'hypothèse d'un rôle actif de l'organisme dans la production des agglutinines. Moi-même, j'ai injecté une grande quantité de premier vaccin du charbon à des chiens; le sérum était déjà très agglutinant douze à quinze heures après l'injection, et, les jours suivants, le titre d'agglutination a diminué peu à peu. De plus, M. Gengou a constaté, aussi bien chez l'animal neuf que chez le chien soumis à de fortes injections de premier vaccin, que les divers organes, les exsudats leucocytaires, les globules blancs du sang, renfermaient infiniment moins d'agglutinines que le sérum. Toutes ces observations doivent nous faire

admettre qu'en ce qui concerne le charbon tout au moins, la propriété agglutinante du sérum n'est pas due à des réactions cellulaires, contrairement aux propriétés préventive ou anti-toxique : celles-ci, dans l'état actuel de nos connaissances, paraissent bien être le résultat d'une activité toute particulière des organes, sous l'influence des microbes ou de leurs produits.

4. Liège, Institut pathologique et bactériologique.

L'AGGLUTINATION DU BACILLE CHARBONNEUX

PAR LE SANG HUMAIN NORMAL

PAR MM. LAMBOTTE ET MARÉCHAL.

On connaît bien le pouvoir agglutinant du sang normal vis-à-vis de certains microbes. Mais, en général, pour constater cette propriété, il faut employer le sérum pur, ou très peu dilué. Si l'on dilue un peu fortement le sérum normal, jusqu'à 1/50, 1/100 par exemple, le phénomène de l'agglutination des microbes ne se produit plus. On n'a guère signalé que deux exceptions à cette règle : certains sujets fournissent un sérum qui agglutine le *bacterium coli* parfois à des dilutions atteignant 1/100 et même davantage ; Bourges et Méry, d'autre part, disent avoir vu les bacilles de la morve s'agglutiner par le sang normal de cheval à une dilution de 1/200 au maximum, mais ils ne disent pas après combien de temps d'action des agglutinines. Si l'on met de côté ces faits, on peut dire, en thèse générale, qu'il n'y a vraiment que les sérum spécifiques, c'est-à-dire provenant d'animaux soumis à l'influence d'espèces bactériennes déterminées, qui, à des dilutions considérables, agglutinent le microbe correspondant, à l'exclusion des autres microorganismes. Un sérum qui agglutine, par exemple, le bacille typhique à des dilutions de 1/500 est considéré comme provenant d'un sujet sensibilisé par les produits du bacille d'Eberth, et ainsi de suite.

Nous venons de découvrir un sérum normal doué d'un pouvoir d'agglutination très considérable vis-à-vis d'une bactéries déterminée, sans qu'il puisse être question de l'action sur l'organisme des produits du microbe homologue : il s'agit du sérum humain, qui agglutine normalement, dans de nombreux cas, le bacille du charbon, et à des dilutions telles, qu'on pourrait considérer, dans ces cas, le sérum comme véritablement spécifique.

On sait que les bactéridies du charbon ne se prêtent pas à l'étude du phénomène de l'agglutination parce qu'elles sont presque toujours accolées les unes aux autres dans les cultures,

et que l'on ne peut préparer avec celles-ci des émulsions homogènes. Mais, au moyen du bacille du charbon atténué sous forme de premier vaccin, on prépare, avec un peu d'habitude, de belles émulsions de grands bacilles bien isolés, qui offrent un excellent *test-objet* pour l'étude de l'agglutination : on prend le dépôt d'une culture de deux jours sur gélose, et on l'émulsionne dans de l'eau distillée. Si à une anse de cette émulsion, déposée sur porte-objet, montrant des bacilles bien libres, on mélange une anse de sérum humain, pris chez les sujets les plus variés, on constate presque toujours une très forte agglutination, et ce, presque instantanément. Le sérum de certaines personnes provoque encore le phénomène, même quand on l'a dilué préalablement au 1/500.

Nos essais ont porté sur 41 personnes. Le sang était recueilli aseptiquement à la pulpe du doigt. Chez quatre sujets, tout à fait sains, adultes, dont un nègre, le sérum a agglutiné encore et instantanément à des dilutions respectives de 1/250, 1/150, 1/160 et 1/350. — Le *bacillus typhosus* et le *bacterium coli* n'étaient déjà plus agglutinés quand le sérum de ces personnes était dilué au 1/10.

Viennent ensuite sept observations de sujets tuberculeux des deux sexes, à divers stades de la maladie. Le titre maximum de l'agglutination du charbon a été de 1/150, 1/50, 1/200, 1/500, 1/100, 1/200 et 1/100. L'agglutination encore nette, et instantanée à 1/500, a été constatée chez une femme atteinte de tuberculose avancée. Le *bacterium coli*, le *bacillus typhosus*, et le bacille cholérique n'étaient plus agglutinés par ce sérum à 1/20.

Dans la fièvre typhoïde, à côté de la propriété agglutinante vis-à-vis du bacille d'Eberth, on peut très bien observer l'agglutination du charbon, et généralement pour des dilutions de sérum plus considérables que pour le bacille typhique. Nous possédons neuf observations de fièvre typhoïde à divers stades de la maladie, donnant les titres agglutinatifs suivants :

Vis-à-vis du *bacillus typhosus* : 1/60, 1/60, 1/50, 1/50, 1/80, 1/90, 1/60, 1/50 ;

Vis-à-vis du charbon : 1/300, 1/150, 1/250, 1/100, 1/50, 1/200, 1/100, 1/350.

Que l'on n'oublie pas que le titre est déterminé en fixant la dilution maxima au delà de laquelle on n'obtient plus d'aggluti-

nation *instantanée*. Si on laisse les réactifs en présence plusieurs heures, on arrive à des dilutions beaucoup plus considérables, tant pour le *typhosus* que pour le charbon.

Enfin, chez treize malades, atteints respectivement de saturnisme, d'ankylostomiasie, de paralysie spastique, d'amygdalite suppurée, de pneumonie franche, de néphrite chronique, de rhumatisme chronique, d'entérite, d'ataxie locomotrice, de carcinome de l'estomac, de néphrite aigue, de chorée, de grippe, partout, on observa l'agglutination du charbon par le sérum aux titres maxima respectifs de : 1/300, 1/50, 1/250, 1/250, 1/100, 1/100, 1/150, 1/150, 1/100, 1/50, 1/50 et 1/100.

Jamais nous n'avons observé une agglutination instantanée aussi considérable vis-à-vis du *bacterium coli*, du bacille de Friedländer, du *bacillus typhosus* (en dehors des cas typhiques), du bacille de Sirault (van Ermengen).

Nous avons recherché si ce pouvoir agglutinant vis-à-vis du *bacillus anthracis* se retrouvait dans d'autres humeurs que le sérum. L'urine de quatre personnes, dont le sérum agglutinait encore à 1/200, n'agglutinait pas les bacilles du charbon, même à parties égales. Il en était de même de la sécrétion sudorale et des larmes provenant de ces mêmes personnes. Quant au lait, il s'est montré doué d'un léger pouvoir agglutinant, mais pas comparable à celui du sérum. Tandis que le sérum, chez quatre femmes, donnait la réaction agglutinante aux dilutions respectives de 1/50, 1/80, 1/50 et 1/100, le lait agglutinait à peine à 1/10.

Il était intéressant de s'assurer s'il existait une différence au point de vue de l'agglutination du charbon, entre le sérum de sang d'adulte et celui de nouveau-né. Nos observations ont porté sur le sang des quatre femmes précitées et sur celui de leurs nourrissons. Ceux-ci, âgés respectivement de 12 heures, un jour, trois jours et huit jours, nous ont fourni des sérum dont les taux agglutinatifs étaient de 1/50, 1/40, 1/60 et 1/50. Si l'on compare ces taux à ceux du sérum des mères de ces nourrissons, on peut conclure que le sang du nouveau-né se comporte vis-à-vis du charbon comme celui de l'adulte.

Les divers animaux (rat, cobaye, chien, chèvre, lapin, bœuf, cheval), dont le sérum a été vérifié, n'ont pas montré cette agglutination si considérable vis-à-vis du charbon. Le maximum a été

de 1/30. Le sérum spécifique d'un cheval de M. van de Velde, agglutinant le *bacillus typhosus* au cent-millième, n'agglutinait le charbon qu'au centième.

Quant à la répartition de la substance agglutinante dans l'organisme, nous l'avons étudiée sur le cadavre d'un homme de 16 ans, ayant succombé à une tuberculose (mal de Pott). Le sérum du sang du cœur agglutinait le charbon à 1/120. On a pris des morceaux de rate, de foie, de moelle osseuse, de rein, de corps thyroïde, de capsules surrénales, de pancréas, débarrassés le plus possible du sang. On a pris les mêmes poids de chacun, et divisé en deux parts : l'une a été triturée dans un mortier avec du quartz, l'autre a été soumise aux vapeurs d'éther, pour épuiser les tissus (Duclaux, tome II, p. 103). L'agglutination essayée avec les produits, convenablement filtrés, de ces manipulations s'est toujours montrée incomparablement moindre qu'avec le sérum du sang lui-même.

Il ne semble donc pas que, chez l'homme, les agglutinines du charbon s'élaborent dans les organes où se forment les lysines, les anticorps, etc.

Cette agglutination si considérable du bacille du charbon par le sang humain est un fait qui vient à l'encontre de la thèse (Nicolle, Dineur, etc.) qui attribue à l'appareil ciliaire une importance prépondérante dans le mécanisme de l'agglutination : le bacille du charbon n'a pas de cils.

Au point de vue pratique, il y aura lieu d'être prudent en matière de séro-diagnostic dans l'infection charbonneuse. Un bon travail de M. de Nobele, fait au laboratoire de M. van Ermengen, vient d'attirer l'attention sur l'importance du séro-diagnostic dans les accidents alimentaires, dus à certaines viandes. Le sérum d'un grand nombre de personnes, d'une localité du nom de Sirault, devenues malades à la suite de l'ingestion d'un pâté de viande, agglutinait fortement le microbe spécifique retrouvé dans celui-ci; ce microbe est dénommé bacille de Sirault. M. Hermann, à Mons, a constaté les mêmes faits. Supposons un instant que des accidents alimentaires soient imputés à l'ingestion d'une viande charbonneuse; on prend du *bacillus anthracis*, et on constate que le sérum des personnes malades agglutine celui-ci à des dilutions considérables : nul doute, semble-t-il, que le phénomène ne soit dû à la sensibilisation

de ces personnes par le microbe du charbon! S'il en était ainsi, presque toutes les observations publiées dans ce travail se rapporteraient à des accidents charbonneux.

Il y a donc lieu, quand il s'agit du charbon, d'être très prudent en matière de séro-diagnostic.

Liège, Institut bactériologique et clinique médicale, mai 1899.

Étude sur les rapports entre les agglutinines et les lysines DANS LE CHARBON

PAR O. GENGOU

On ne possède pas encore d'étude systématique sur l'agglutination dans le charbon. Le seul travail qui, à notre connaissance, a donné quelques indications, tout à fait sommaires d'ailleurs, sur le pouvoir agglutinant d'animaux charbonneux est celui de Sawtchenko¹. Ce savant a surtout étudié les pouvoirs bactéricide et préventif des animaux immunisés contre le charbon. Il n'est pas étonnant que cette étude n'ait pas été poursuivie aussi à fond que celle de l'agglutination dans la fièvre typhoïde, le choléra, etc. Le phénomène de l'agglutination d'un microbe donné ne peut être étudié qu'au moyen d'émulsions où les microbes se présentent bien isolés les uns des autres ; or, on ne réussit pas à préparer des liquides où les bactéridies du charbon soient libres ; les bâtonnets sont toujours plus ou moins accolés dans les cultures en bouillon et dans les émulsions préparées avec les dépôts sur gélose, sur gélatine, etc.

Heureusement, comme on l'a vu dans les mémoires précédents, on peut arriver à préparer de bonnes émulsions, convenables pour l'étude de l'agglutination du charbon, si l'on s'adresse, aux microbes du 1^{er} vaccin charbonneux ; ces émulsions sont un excellent *test objet* pour l'étude de l'agglutination.

On sait que le sang *normal* présente le pouvoir d'agglutiner à une concentration déterminée certains microbes ; *agit-il de même vis-à-vis du 1^{er} vaccin du charbon ?*

1. SAWTCHENKO : Contribution à l'étude de l'immunité, *Ann. Pasteur*, décembre 1897.

Nous avons vérifié, à ce point de vue, le sang d'un assez grand nombre d'animaux. Disons, une fois pour toutes, que la détermination du pouvoir agglutinant a toujours été faite de la façon suivante. On prend une culture de 2 jours, sur gélose à 22°, du 1^{er} vaccin du charbon; on émulsionne une anse dans 1 c. c. d'eau distillée; on s'assure que les bacilles sont bien isolés, que l'émulsion ne présente pas d'amas spontanés. Dans un verre de montre, on dépose une goutte de sérum que l'on additionne de quantités croissantes d'eau distillée, ajoutée goutte par goutte; après chaque addition, on prend une anse de la dilution que l'on mélange sur porte-objet à une anse d'émulsion charbonneuse; on laisse la préparation 1/4 d'heure en chambre humide¹, à la température du laboratoire, en même temps que des préparations témoins sans sérum; puis on recherche les amas de bacilles au microscope. Un sérum dont le titre agglutinatif est de 1/100 est celui dont une goutte additionnée de 50 gouttes d'eau distillée au maximum, constitue un mélange dont une anse peut agglutiner une anse d'émulsion charbonneuse après un 1/4 d'heure en chambre humide.

Pouvoir agglutinant du sérum normal.

Certains animaux fournissent un sérum qui n'agglutine pas du tout le charbon; tels sont la souris et le pigeon. D'autres agglutinent, mais il faut de fortes concentrations; c'est le cas pour les rats qui, adultes ou fœtus, n'agglutinent qu'à 1/10, le cheval à 1/30 et la chèvre à 1/40. Quelques-uns agglutinent encore le bacillus anthracis à des dilutions déjà considérables, par exemple, le cobaye donne des amas à 1/40 instantanément, le bœuf à 1/120, et le chien à 1/100 après 1/4 d'heure.

Enfin, — et cela fait l'objet d'un travail entrepris en même temps que le nôtre par MM. Lambotte et Maréchal, — le sang humain normal, chez beaucoup de sujets, jouit d'un pouvoir agglutinant tout à fait remarquable, presque spécifique, allant jusque 1/500 vis-à-vis du bacillus anthracis².

Pouvoir agglutinant du sérum d'animaux immunisés.

On sait que, en injectant à des animaux des cultures typhique

1. Beaucoup d'auteurs n'indiquent pas le temps d'observation: c'est un facteur essentiel pour la détermination du titre agglutinatif.

2. Voir *Annales Pasteur*, août 1899.

ou cholérique, on obtient un sérum doué d'un pouvoir agglutinant très considérable vis-à-vis du microbe correspondant. *En est-il de même dans le charbon?* *A priori*, il n'était pas possible de répondre d'une façon affirmative à cette question; il est, en effet, démontré que, dans certaines affections, les processus immunisants confèrent bien aux humeurs un pouvoir anti-toxique ou préventif, mais nullement la propriété agglutinante¹. Ce sont là des propriétés absolument dissociables.

Nous avons étudié l'agglutination expérimentale chez le chien, le cobaye et la chèvre. Les animaux ont reçu sous la peau des injections d'émulsion de charbon vaccin I non chauffées.

Voyons d'abord l'effet d'une seule injection.

Au chien I, de taille moyenne, dont le pouvoir agglutinant maximum du sang normal était de 1/100, nous injectons sous la peau du dos 1 c. c. d'émuision de vaccin I.

Dès le lendemain, le pouvoir agglutinant du sang était de 1/320. Ce titre est resté tel, sans variations prononcées, pendant une quinzaine de jours, et il est revenu graduellement au taux du point de départ au 21^e jour.

Au chien II (pouvoir agglutinant normal 1/70), nous injectons, tous les 2 jours régulièrement, des doses croissantes de vaccin I; parti de 1 c. c. d'émuision, nous arrivons à lui injecter en une fois 6 c. c.. Ces injections ont été faites pendant 2 mois. Le sérum a fini par agglutiner à 1/900. Ce pouvoir agglutinant a pu être maintenu par de petites injections répétées de 3 en 3 jours.

Au chien III (pouvoir agglutinant normal 1/80), nous injectons pendant 1 mois, tous les deux jours régulièrement, des doses croissantes de vaccin I, de façon à arriver à lui injecter en dernier lieu, en une fois, tout le dépôt de 2 cultures sur gélose de 2 jours à 22°; après ce temps son pouvoir agglutinant atteint 1/1100.

Le pouvoir agglutinant peut donc être exalté chez les chiens immunisés. On remarque seulement que le titre, malgré de nombreuses injections, ne devient pas aussi élevé que pour le typhus et le choléra chez les animaux injectés avec les microbes correspondants.

Chez le cobaye, on arrive aussi à obtenir un sérum agglutinant, mais moins fort; 2 cobayes ont reçu tous les jours pendant

1. METSCHNIKOFF, Immunität. *Handbuch der Hygiene* 1897.

3 mois, de petites injections de vaccin I (jamais plus de 1 1/2 c. c.) Le pouvoir agglutinant, qui était normalement de 1/40, est monté chez l'un à 1/120, chez l'autre à 1/300 (dans ces cas, il s'agit d'agglutination instantanée).

Il en est de même chez la chèvre; par des injections pratiquées tous les jours et à des doses ne dépassant jamais 2 c. c., nous avons porté le pouvoir agglutinant d'une chèvre de 1/40 à 1/400 après 2 mois.

On sait, d'après Fodor, que les injections de certaines substances renforcent l'immunité charbonneuse; c'est le cas pour le bicarbonate de soude. Nous avons voulu savoir si, en injectant en même temps que le vaccin I, mais à un autre point de la peau, de fortes doses (10 c. c.) de bicarbonate de soude à 10 0/0 dans l'eau, le pouvoir agglutinant ne serait pas augmenté. Il n'en a rien été; au contraire, l'ascension de ce pouvoir agglutinant s'est faite plus lentement que chez le témoin.

Nous nous sommes demandé aussi si le pouvoir agglutinant ne serait pas plus considérable après des injections, non plus de vaccin I, mais de charbon virulent. Nous avons injecté à deux petits chiens de même poids le dépôt d'une culture sur gélose de 1 jour à 37°, au premier de charbon virulent, au second de vaccin I. Le lendemain, le pouvoir agglutinant du 1^{er} pour le vaccin I, qui auparavant était de 1/50, est toujours resté au même taux de 1/50; chez le second, au contraire, le pouvoir agglutinant, auparavant de 1/70, est passé le lendemain à 1/200, et, 3 jours après, il était de 1/800, sans que l'on ait renouvelé l'injection. Un prochain travail de M. Malvoz développera ces trois importantes constatations d'une agglutination spécifique pour la race microbienne injectée et non pour l'espèce.

PROPRIÉTÉS DES AGGLUTININES DU CHARBON

I. *La propriété agglutinante du sérum de ces animaux était-elle spécifique?*

Nous avons vérifié, à ce point de vue, les bacilles typhique, cholérique, le colo-bacille, le bac. pyocyaneus, le vibrio-Metchnikovi. Aucune de ces émulsions n'a été agglutinée par le sérum dilué au 1/20.

Il s'agit donc bien d'un sérum spécifique. Cette spécificité va

très loin, car nous avons vu que si l'on injecte à deux chiens, à l'un du 1^{er} vaccin, à l'autre du charbon virulent, le sérum du premier agglutine le 1^{er} vaccin, mais pas celui du second.

II. *Le pouvoir agglutinant du sérum vis-à-vis du charbon passe-t-il au fœtus?*

Nous nous sommes servi, pour étudier ce point, d'une chèvre dont le pouvoir agglutinant avait été porté, alors qu'elle était pleine, de 1/40 à 1/400, comme il a été dit plus haut. A ce moment, la chèvre mit bas 3 petits dont nous avons examiné le sang et la sérosité péricardique au point de vue agglutinant; nous n'y avons jamais trouvé un pouvoir agglutinant supérieur à 1/18, c'est-à-dire que les *agglutinines du charbon ne semblent pas passer au fœtus, chez l'animal immunisé.*

III. *Les agglutinines transsudent-elles du sang dans les liquides de l'organisme?*

Nous avons, à ce sujet, expérimenté le sang et des liquides transsudés, tant chez l'organisme sain que chez l'animal immunisé par des injections de charbon vaccin I.

Sujets normaux : Chez un homme dont le sérum sanguin agglutine à 1/80, le liquide d'une pleurésie séreuse aiguë n'agglutine qu'à 1/8. Chez un chien normal agglutinant à 1/40, le liquide d'œdème obtenu par la ligature d'une patte n'agglutine qu'à 1/16.

Sujets immunisés : Le même procédé (ligature) nous donne chez un chien agglutinant à 1/320, des phlyctènes à la patte; le liquide des bulles agglutine à 1/200; chez un second chien agglutinant à 1/800, le liquide d'œdème malheureusement très rouge (contenant donc probablement une certaine quantité de sang pur) a un pouvoir agglutinant de 1/600. Enfin, chez un cobaye agglutinant à 1/300, un œdème inflammatoire étendu fournit un liquide qui n'agglutine qu'à 1/150.

En résumé, les *agglutinines peuvent passer à travers les parois vasculaires; seulement elles sont loin d'y passer en totalité*. Les écarts notables que nous constatons dans le pouvoir agglutinant des liquides expérimentés, tiennent certainement aux différences qui existent nécessairement dans les conditions expérimentales, qui sont très difficiles à remplir chaque fois de la même façon.

IV. *Les agglutinines du charbon peuvent-elles dialyser?*

Si, comme Buchner l'a fait pour les substances bactéricides, nous mettons dans un dialyseur en parchemin 8 c. c. de sérum agglutinant à 1/800, et si nous plongons ce dialyseur dans 3 1/2 litres d'eau distillée et stérilisée, on constate, après avoir laissé l'appareil pendant 27 heures à 4°, que le pouvoir agglutinant du sérum est tombé de 1/800 à 1/120. En somme, *les agglutinines dialysent parfaitement quand le liquide inférieur est de l'eau distillée.*

Buchner a ingénieusement modifié cette expérience en remplaçant cette eau distillée par du sérum artificiel, cherchant ainsi à se rapprocher du sérum normal du chien. Nous avons fait de même pour les agglutinines, mais en nous rapprochant davantage encore de ce sérum normal de chien. Nous basant sur les chiffres donnés par Hoppe-Seyler sur la teneur en sels de ce sérum, nous avons ajouté à 3 1/2 l. d'eau distillée stérilisée les quantités nécessaires de Na^2SO^4 , NaCl , Na^2HPO^3 , et Na^2CO^3 . Après 24 heures de dialyse à 4°, nous avons constaté que le pouvoir agglutinant du sérum était encore de 1/400, c'est-à-dire diminué seulement de moitié. En résumé, *les agglutinines du charbon qui dialysent bien quand le liquide inférieur est de l'eau distillée, passent aussi, en assez forte proportion, quand ce liquide se rapproche chimiquement du sérum normal du chien.*

Nous avons également recherché quelle était la façon de se comporter des agglutinines, quand on remplace le dialyseur en parchemin par un sac en collodion. Chez un cobaye, dont le sérum sanguin agglutine, après des injections multiples, à 1/120 instantanément, nous introduisons dans la cavité péritonéale un sac en collodion renfermant une émulsion de charbon vaccin I; 15 heures après, le sac est retiré et l'on ne constate au microscope absolument aucun amas microbien. Par conséquent, *les agglutinines ne passent pas à travers un sac de collodion mis dans la cavité péritonéale d'un animal immunisé*, ainsi qu'il fallait s'y attendre d'après les essais obtenus au moyen des transsudats.

V. *Quelle est l'action des hautes et des basses températures sur les agglutinines du charbon?*

L'action de la chaleur a été examinée par divers auteurs déjà en ce qui concerne les agglutinines développées chez les typhoï-

diques et les cholériques. Comme eux, nous avons chauffé à 55° pendant 45 minutes 1 c. c. d'un sérum agglutinant à 1/160 ; après refroidissement, le pouvoir agglutinant était conservé intact. Il en a été de même pour un sérum agglutinant à 1/800 et qui, pour être stérilisé, a été soumis 3 jours de suite pendant 2 heures à une température de 56°.

Les agglutinines du charbon se comportent donc comme les agglutinines classiques vis-à-vis de la chaleur.

D'un autre côté, nous avons soumis, à deux reprises, 1 c. c. d'un sérum agglutinant à 1/250 à la congélation pendant plusieurs minutes ; examiné ensuite, le pouvoir agglutinant était demeuré le même.

VI. *Le sérum agglutinant spécifique est-il bactéricide ?*

Cette question soulève un point doctrinal très important. Comme vient de le faire remarquer Bordet¹, dans beaucoup de travaux sur les substances bactéricides des humeurs, on a négligé de tenir compte du phénomène de l'agglutination. Pour déterminer si un sérum est bactéricide, on a procédé généralement de la façon suivante : à une quantité donnée de sérum, on ajoute une anse d'émulsion de microbes, et de temps en temps, on prélève une anse de ce mélange, que l'on ensemence en gélatine, coulée ensuite en plaque Pétri. On compte chaque fois les colonies. Or, il peut très bien se faire que l'on obtienne moins de colonies après une heure qu'après dix minutes, par exemple, sans que l'on puisse conclure qu'un certain nombre de microbes aient été tués par le sérum ; il a suffi que celui-ci ait agglutiné ces microbes ; ces amas, en gélatine, ne donneront qu'une colonie.

Pour éviter cette cause d'erreur, nous nous y sommes pris de la façon suivante : à 1 c. c. de sérum normal de chien agglutinant seulement à 1/30, nous ajoutons 5 gouttes d'émulsion de charbon vaccin I : ce centimètre cube de sérum eût suffi à agglutiner 30 c. c. de la même émulsion. En même temps, nous délayons, dans un centimètre cube d'eau distillée, 5 gouttes de la même émulsion. De chacune de ces deux préparations, nous prenons une anse que nous ensemencons en gélatine, et nous faisons

1. BODET, Le mécanisme de l'agglutination, ces *Annales*, Mars 1899.

une préparation microscopique colorée au bleu de méthylène phéniqué, et cela immédiatement après l'ensemencement, puis 1/2 heure après, et encore 5 heures après. Tandis que les plaques obtenues avec la culture en eau distillée nous donnent toujours des colonies innombrables, celles que nous obtenons de la culture en sérum nous donnent successivement 2,163, 2,888, puis 5013 colonies, immédiatement après, puis 1/2 heure, puis 5 heures après l'ensemencement en sérum. En même temps, les préparations microscopiques nous montrent des amas toujours bien colorés et de plus en plus considérables.

En d'autres termes, la différence entre le nombre de colonies de la plaque témoin et celui de la première plaque obtenue de la culture en sérum ne peut être due qu'aux agglutinines du sérum normal, car il est évident que le pouvoir bactéricide du sérum, s'il avait existé, n'aurait pas eu le temps d'agir immédiatement au moment de l'ensemencement. La multiplication des colonies dans la 3^e plaque prouve *l'absence de substances bactéricides dans le sérum normal du chien.*

VII. *L'agglutination notablement augmentée par les injections de vaccin charbonneux chez le chien s'accompagne-t-elle d'un pouvoir bactéricide anormal?*

Nous avons opéré de la même façon que pour le chien normal, en ensemencant des tubes témoins et des tubes avec sérum spécifique; seulement, pour rendre plus évident encore le rôle de l'agglutination dans les résultats de l'expérience, nous avons ensemencé, dans d'autres tubes de sérum, un microbe que le sang du chien n'agglutine pas, le staphylocoque pyogène. Tandis que les tubes témoins et les cultures de staphylocoque, chauffées ou non, nous ont toujours donné, en plaques Pétri, des colonies innombrables, les cultures en sérum de 1^{er} vaccin, chauffées ou non, ne nous ont donné, immédiatement après l'ensemencement en sérum, que 25 et 30 colonies; les plaques faites 3 heures après donnaient 120 et 71 colonies, et 22 heures après, les colonies étaient devenues innombrables, ce qui s'est continué les jours suivants. Par conséquent, c'est encore à l'agglutination — ce qu'ont, du reste, montré les préparations microscopiques colorées — qu'il faut attribuer la chute du nombre de colonies dans les premières plaques. Les dernières ont démontré, comme

pour le sérum normal, que le sérum du chien immunisé ne contient pas de substances germicides. Ce qui le prouve du reste à l'évidence, c'est que le sérum chauffé n'a pas donné plus de colonies que le sérum non chauffé : or il est démontré que la chaleur détruit les substances bactéricides du sérum. *Le sérum agglutinant spécifique n'est donc pas plus bactéricide que le sang normal.*

Ce qui prouve du reste, d'une façon encore plus certaine, que l'agglutination des microbes n'entraîne pas leur mort, c'est-à-dire que les agglutinines et les lysines sont des substances absolument différentes, c'est le fait qu'il est parfaitement possible de suivre la multiplication des microbes agglutinés sous le microscope. Pour cela, on ajoute à 36 gouttes, par exemple, de gélatine stérilisée et renfermée en tube stérile, 2 gouttes du sérum spécifique et 2 gouttes d'émulsion microbienne. On place le tout à 37° pendant une 1/2 heure environ ; après quoi on dépose, de cette culture, une ou deux anse en goutte pendante sous le microscope ; dès qu'on a trouvé un amas microbien bien isolé, on fixe ce point de la préparation : le tout est porté à 22° et tenu en observation.

Nous nous sommes convaincu de la sorte qu'un sérum de chien, agglutinant le charbon vaccin I à 1/200, et employé à la dose de 1/20, n'empêchait nullement la prolifération des microbes agglutinés ; même le sérum au titre de 1/900 n'exerce pas d'action empêchante à la forte dose de 1 p. 20. Il y a plus : un sérum de typhoïdique agglutinant à 1/500, un typhus-sérum (de M. van de Velde), agglutinant à 1/100000, employés au 1/10, ont permis au *bacillus typhosus* de se multiplier dans les conditions précitées. Par conséquent, pas la moindre action bactéricide ; *agglutinines et lysines sont des substances différentes.*

Du reste, la même conclusion se dégage de nos expériences de dialyse. Si, ainsi que Buchner l'a démontré, les substances bactéricides dialysent bien dans l'eau pure, de même que les agglutinines, celles-ci passent dans le sérum normal, alors que les lysines restent dans le dialyseur.

D'autre part, ainsi que MM. Malvoz et Lambotte l'ont constaté, les lysines de la fièvre typhoïde traversent parfaitement les sacs de collodium chez les cobayes immunisés ; nous avons vu que cette propriété n'appartient pas aux agglutinines.

Le bicarbonate de soude qui renforce l'état bactéricide n'augmente pas le pouvoir agglutinant.

Enfin, si agglutinines et substances bactéricides se comportent de la même façon vis-à-vis de la congélation, les premières sont réfractaires, les secondes sensibles aux températures de 55 à 60°.

VII. *Existe-t-il une relation quelconque entre la propriété agglutinante et la leucocytose ?*

On admet généralement que les propriétés bactéricide et préventive sont, pour beaucoup de maladies, intimement liées à la proportion des leucocytes, et particulièrement des leucocytes polynucléaires, qui circulent dans les humeurs. Si, ainsi que Gruber¹ et Courmont² en ont émis l'hypothèse, le pouvoir agglutinant marche de pair avec la propriété protectrice d'un sérum (Gruber) ou avec son pouvoir atténuant (Courmont), il semble qu'il doive exister quelque rapport entre la leucocytose (polynucléaire) et l'agglutination.

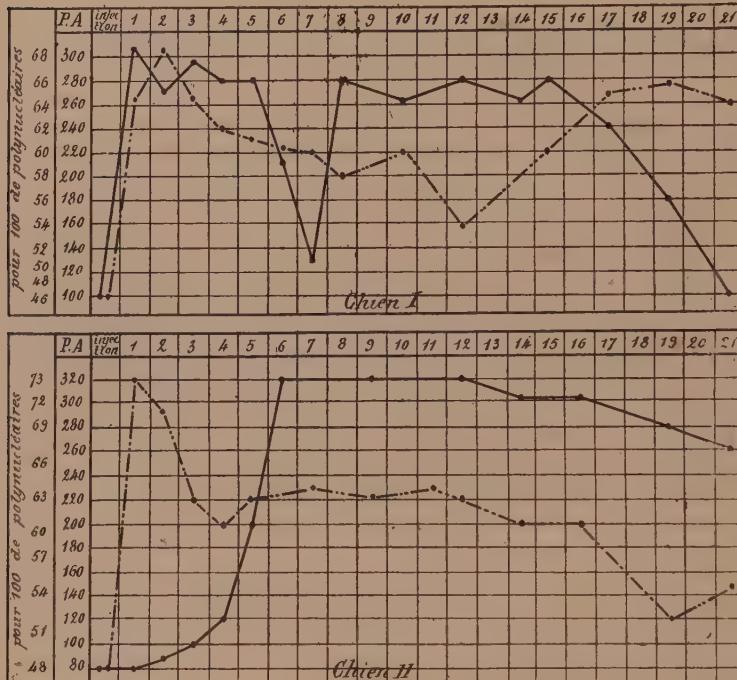
Nous avons suivi simultanément les variations du pouvoir agglutinant et de la proportion de polynucléaires dans le sang chez 2 chiens, dont l'un avait reçu une injection de 1 c. c. d'émulsion charbonneuse, et le second, en outre, une injection de 20 c. c. de bicarbonate de soude à 10 0/0. Pour rechercher la proportion de leucocytes polynucléaires, nous avons compté, dans trente champs microscopiques pris au hasard dans trois préparations, tous les leucocytes d'une part et les polynucléaires de l'autre, ce qui donne une approximation assez exacte. Voici, sous forme de figures, nos résultats :

Ces tracés nous montrent, surtout celui du chien II, la discordance la plus complète entre l'ascension des polynucléaires qui se fait ici beaucoup avant celle du pouvoir agglutinant, alors que pour le chien I le summum du pouvoir agglutinant (P. A.) est atteint avant celui des polynucléaires. Cette discordance se continue dans le milieu de la courbe pour chacun des tableaux, et pour la fin il suffit de jeter un coup d'œil sur le tableau du

1. GRUBER, *Münchener medicin. Wochenschrift*, n° 9, 1896.

2. COURMONT, *Thèse de Lyon*. Sur le séro-pronostic de la fièvre typhoïde.

chien I pour constater toute *absence de rapport entre la proportion de polynucléaires dans le sang et la propriété agglutinative*.



S'il en est ainsi, nous devons retrouver dans un sang *complet*, mais privé de ses leucocytes polynucléaires, la totalité du pouvoir agglutinant. Nous sommes, en effet, arrivé à ce résultat en faisant pour les agglutinines ce que MM. Denys et Havet ont fait pour les substances germicides du sang du chien, c'est-à-dire en filtrant du sang rendu incoagulable. Après avoir constaté que l'oxalate de potassium est sans influence sur le pouvoir agglutinant, nous avons filtré un sang agglutinant à 1/800 et additionné d'un peu d'oxalate; le liquide filtré, privé de leucocytes, agglutine aussi bien que le sérum obtenu par coagulation.

Mais certains savants (Bail¹, par exemple) ont soutenu que les leucocytes polynucléaires n'émettaient les substances bacté-

1. Pour la bibliographie des travaux sur les substances bactéricides et les leucocytes, voir la belle revue de Besredka. *Annales Pasteur*, 1898, p. 607.

ricides qu'après leur mort. *Les leucocytes morts dégagent-ils des agglutinines?* Si oui, il faudra bien admettre qu'il y a, sinon identité, du moins grande parenté d'origine entre les agglutinines et ces substances germicides.

Par divers moyens, plusieurs auteurs sont arrivés à fabriquer des extraits leucocytaires jouissant de propriétés microbicides très marquées. Ce sont leurs procédés que nous avons appliqués, et cela aussi bien sur des leucocytes provenant d'animaux normaux que d'animaux injectés par le vaccin I.

Un abcès s'étant développé chez un enfant dont le sérum sanguin agglutinait à 1/80, nous avons traité le pus qu'il contenait par les procédés employés par Lowit, Schattenfroh (2 procédés) et Büchner. Ce sérum du pus agglutinant à 1/30, chacun de ces extraits ne nous a donné qu'une agglutination de 1/24.

De même chez un chien agglutinant à 1/600, l'extrait Büchner du pus d'un abcès sous-cutané n'agglutine qu'à 1/80; chez un cobaye qui agglutine à 1/100, cet extract d'un abcès donne un liquide agglutinant à 1/10; chez un chien agglutinant à 1/900, l'extrait Lowit ne donne qu'un pouvoir agglutinant à 1/220.

D'autre part, ayant obtenu au moyen d'une injection intrapleurale de gluten-caséine un empyème chez un chien agglutinant à 1/320, l'extrait Büchner agglutinait seulement à 1/80; enfin, un chien agglutinant à 1/900 nous ayant fourni par le même procédé un pus pleural assez abondant, nous avons pu appliquer tous les procédés employés pour l'obtention des extraits leucocytaires; toujours nous avons obtenu une agglutination variant entre 1/60 et 1/200.

En résumé, tant à l'état normal que chez les animaux dont on a exalté le pouvoir agglutinant par des injections multiples de charbon vaccin I, on peut affirmer que les leucocytes vivants ne sont nullement les producteurs ou les détenteurs des agglutinines, et par conséquent que, à l'inverse des substances bactéricides, leur mort n'amène pas le passage de ces substances dans le sérum, où elles existent du reste primitivement.

* *

Si les globules blancs ne semblent pas intervenir dans la production des agglutinines, d'autres organes ne jouent-ils pas un rôle plus direct dans leur élaboration?

Cette question, étudiée par plusieurs auteurs déjà, a reçu les réponses les plus diverses et les plus contradictoires. Nous l'avons également examinée en ce qui concerne les agglutinines du charbon chez l'animal normal d'abord, chez l'animal immunisé ensuite. Toujours le sujet a été tué par la saignée carotidienne, de façon à rendre ses organes le plus possible exsangues et à écarter les causes d'erreur qui auraient pu résulter de la présence du sang. Tous les organes ont été examinés de la même façon, consistant, comme pour l'extrait Lowit, à les broyer avec une quantité déterminée d'eau et de sable, et à vérifier le pouvoir agglutinant du liquide surnageant.

Chez un cobaye normal, agglutinant à 1/40, seules les glandes sous-maxillaires nous ont donné un pouvoir agglutinant très peu marqué : 1/14. Chez un cobaye injecté, agglutinant à 1/120, le pancréas nous a fourni un extrait agglutinant à 1/28, les ganglions lymphatiques du cou¹, le foie, la rate et les testicules à 1/14. Enfin, chez un cobaye agglutinant à 1/300, la rate nous a donné un pouvoir agglutinatif de 1/70, les reins à 1/42, la moelle osseuse des fémurs, les glandes sous-maxillaires et les testicules à 1/28, le pancréas et les poumons à 1/14. Les organes que nous ne citons pas ont été examinés, mais leur teneur en agglutinines était tellement faible que nous n'avons jamais constaté d'agglutination chez eux. Or, en dehors de la variété des organes qui, ainsi qu'on peut le voir, nous fournissent, tantôt l'un tantôt l'autre, un certain pouvoir agglutinant, il faut encore que nous fassions remarquer que toujours les organes les plus riches en sang (malgré la saignée) avaient le pouvoir agglutinant le plus fort.

Cela revient à dire que chacun des organes que nous avons examinés n'a jamais possédé qu'un pouvoir agglutinant très inférieur à celui du sérum, pouvoir agglutinant qu'ils devaient sans aucun doute au sang qu'ils contenaient encore. Cela nous permet d'affirmer, contrairement à l'opinion de certains auteurs qui, comme van Emden², ont reconnu un pouvoir producteur d'agglutinines à tous les organes ou à peu près, qu'il est

1. Manfredi et Viola (*Zeitschrift für Hygiène*, Vol. xxx, 1) font jouer un grand rôle aux ganglions lymphatiques, particulièrement du cou, dans l'immunité contre le charbon.

2. VAN EMDEN, *Zeitschr. für Hygiene*, Bd XXX, 1^{er} Hefl, p. 49.

très difficile d'attribuer aux organes ou aux cellules de l'organisme une intervention quelconque dans la fabrication des agglutinines. L'expérience suivante montre du reste combien le rôle de l'organisme semble véritablement passif, tout différent de ce qu'il est notamment dans la production des antitoxines.

Si l'on saigne un animal dont le sang contient des antitoxines, celles-ci se reproduisent rapidement, ainsi qu'il résulte des recherches classiques de Roux et Vaillard, confirmées par Salomonsen et Madsen¹. Saignons un chien que nous avons rendu agglutinant, par des injections successives, à 1/800 : 3 jours après la saignée, son pouvoir agglutinant est de 1/350 et, après 17 jours, il est revenu au taux normal de 1/100 qu'il possédait avant toute injection.

Or, une saignée, dans le cas où tous les organes — ou l'un ou l'autre d'entre eux — interviendraient dans la production d'agglutinines, ne peut évidemment avoir une grande influence sur cette production, et nous devrions voir remonter le taux du pouvoir agglutinant du sang, comme on l'observe quand il s'agit d'antitoxines. Au contraire, si l'organisme est passif, les agglutinines ne se reformeront pas (naturellement dans la supposition qu'on n'injecte plus rien à l'animal) et s'élimineront petit à petit. En enlevant au chien, par la saignée, les 2/5 de son sang, nous avons abaissé sa teneur en agglutinines d'une quantité telle que son sérum n'agglutine plus qu'à 1/350, tout comme un chien qui n'a reçu qu'une seule injection (voir page 644). Comme lui il va éliminer ses agglutinines et cela dans le même laps de temps. C'est en effet ce que nous constatons dans nos expériences.

* * *

Nous avons tenu à donner avec quelques détails les expériences variées que nous avons faites sur l'agglutination dans le charbon, non seulement parce que ce phénomène n'avait guère été étudié dans cette maladie, mais encore parce que ces recherches semblent montrer que, en ce qui concerne tout au moins l'infection charbonneuse, l'agglutination n'est pas un phénomène jouant dans l'immunité et la défense de l'organisme le rôle qu'il y a peu de temps encore, certains auteurs, tels que Grüber, etc., ont voulu lui faire jouer.

1. SALOMONSEN et MADSEN, *Annales Pasteur*, 1898, p. 763.

Au point de vue de l'immunité *naturelle*, par exemple, il n'y a pas la moindre relation à établir entre l'état réfractaire d'un animal au charbon et le pouvoir agglutinant de son sérum; le rat, si réfractaire, a un sérum très peu agglutinant; le chien, réfractaire, agglutine assez fort; l'homme, sensible au charbon, a un sérum qui agglutine parfois presque aussi fort que celui des animaux immunisés; le bœuf, également très sensible, a un sang normal fortement agglutinant, et ainsi de suite.

Il serait également bien difficile de trouver un rapport quelconque entre le pouvoir bactéricide d'un sérum et la faculté agglutinative, envisagée au point de vue de l'immunité. Le rat, dont le sérum — c'est un fait classique — est normalement très bactéricide, n'agglutine pas; pour le chien, c'est le contraire; de plus, le chien ayant reçu de fortes quantités de charbon vaccin I, et dont le sérum est devenu très agglutinant, n'est pas plus bactéricide que normalement.

Considérées au point de vue de leur origine, les propriétés bactéricide et préventive d'une part, et la faculté agglutinative dans le charbon, de l'autre, sont absolument différentes. Alors qu'il est généralement admis que les substances bactéricides et les *anticorps* sont élaborées par les cellules de l'organisme, soit dans le sang, soit dans certains organes (rate, moelle osseuse, etc.), les agglutinines du charbon ne paraissent nullement provenir de ces cellules; ces organes semblent, au contraire, jouer un rôle très passif dans la production des agglutinines.

Quant à leurs caractères comparés, on a vu que les agglutinines se comportaient de la même manière que les substances microbicides vis-à-vis de la congélation, et à peu près de la même façon dans la dialyse à travers un tube en parchemin; au contraire, elles s'en séparent complètement vis-à-vis de l'action des températures élevées, dans la dialyse à travers un sac de collodion, dans l'influence qu'exerce sur leur production une injection de bicarbonate de soude. Les agglutinines ne se régénèrent pas comme les antitoxines, quand on les a mécaniquement enlevées à l'organisme, par la saignée.

1. LONDON (*Archives des sciences biolog. de l'Institut impérial de Saint-Pétersbourg*, Tome VI, n° 2) a en effet démontré que la saignée n'influencait nullement le pouvoir bactéricide du sang.

SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE SUCCINIQUE DANS LES LIQUIDES FERMENTÉS

PAR J. LABORDE ET L. MOREAU

I

L'acide succinique est un des produits principaux de la fermentation alcoolique, qui en engendre toujours de petites quantités, ainsi que l'a montré Pasteur. Dans l'analyse des liquides fermentés de ses expériences, Pasteur¹, pour doser l'acide succinique, épuisait l'extrait sec de ces liquides par un mélange d'alcool et d'éther qui enlevait la glycérine et l'acide succinique; il séparait ensuite les deux corps dissous dans l'eau, après évaporation du premier dissolvant, en saturant l'acide par l'eau de chaux et reprenant l'extrait sec de la dissolution par le mélange éthéro-alcoolique, qui enlevait la glycérine et laissait le succinate de chaux; celui-ci, purifié par l'alcool à 80°, était pesé après dessiccation.

Cette méthode s'appliquait à des liquides de composition relativement très simple, puisqu'ils provenaient de fermentations mises en train avec de l'eau sucrée et de la levure en quantité suffisante; si elle donne de bons résultats dans ces circonstances, il n'en est pas de même quand on veut s'en servir avec des liquides fermentés de composition très complexe comme le vin, comme on l'a reconnu depuis longtemps.

La méthode Macagno² et d'autres encore ont été établies dans le but de remédier aux inconvénients de la méthode Pasteur, mais la plupart sont beaucoup trop compliquées pour un usage courant, et cette complication est loin de garantir l'exactitude des résultats.

Celle qui est la plus ordinairement employée actuellement est

1. Mémoire sur la fermentation alcoolique — *Ann. de ch. et de Phys.* 3^e s., t. LVIII, 1860.

2. *Lavori es. nella R. Staz. di Asti*, 1880.

la méthode de M. Ch. Girard¹ qui peut s'appliquer au vin et à des liquides analogues. On évapore le liquide dans le vide en présence de sable pour diviser le résidu et faciliter son épuisement par l'éther anhydre; le poids de l'acide succinique, obtenu après évaporation de l'éther, est déterminé par un titrage acidimétrique. L'acide succinique, qui a été extrait de cette manière, peut être considéré comme suffisamment exempt d'autres acides, si le liquide qui le contenait provenait d'une fermentation alcoolique pure, mais il est toujours mélangé à de la glycérine qui se dissout aussi partiellement dans l'éther.

La méthode donne donc d'assez bons résultats, mais elle a un inconvénient, c'est d'exiger, comme celle de Pasteur, des évaporations lentes et peu pratiques dans le cas d'essais nombreux à faire simultanément.

On ne peut procéder autrement parce que, d'après Pasteur, on perd des quantités sensibles d'acide succinique quand on termine l'évaporation à l'air libre, à une température supérieure à la température ordinaire. Pasteur n'a pas indiqué la raison de ces pertes, et personne après lui ne paraît s'en être occupé. Il nous a paru intéressant de connaître cette raison : les recherches que nous avons faites dans ce sens nous l'ont fournie et nous ont conduits à une méthode de dosage de l'acide succinique plus expéditive et au moins aussi précise que celles que l'on connaît actuellement. ■

II

Si on procède au dosage de l'acide succinique dans un vin, en évaporant à l'air libre, au bain-marie bouillant, ou à l'étuve à une température même bien inférieure à 100°, on trouve des chiffres qui, comparés à ceux fournis par la méthode Ch. Girard, sont inférieures de 3 à 4 décigrammes par litre. On retrouve des différences analogues en évaporant le vin, non plus à l'air libre, mais dans le vide à une température supérieure à la température ordinaire, pour aller plus vite, à 50° par exemple. Dans ce dernier cas, on peut recueillir les produits de l'évaporation, et l'on constate qu'ils contiennent des acides volatils, mais non de l'acide succinique. Par conséquent, les pertes indiquées ne sont dues ni à une volatilisation ni à un entraînement de l'acide succinique, et elles ne peuvent résulter que d'une réaction se passant au sein

1. Rapport sur les travaux du Laboratoire municipal, Paris, 1885.

du liquide concentré et chaud. Nous avons reconnu, en effet, qu'elles sont la conséquence d'une éthérification de l'acide succinique en présence de la glycérine qui existe dans tous les liquides fermentés : c'est ce qui résulte des expériences suivantes.

On a évaporé à sec au bain-marie bouillant : 1^o une solution aqueuse d'acide succinique contenant 0 gr. 1 de ce corps ; 2^o la même solution, à laquelle on avait ajouté 0 gr. 4 de glycérine ; 3^o on a prolongé de 2 heures le séjour au bain-marie d'un autre essai pareil au précédent, après sa dessiccation complète ; 4^o on a ajouté à la solution d'acide succinique et de glycérine quelques gouttes d'acide chlorhydrique, et l'on a évaporé à sec. La détermination de l'acide succinique libre dans les différents essais a donné les résultats suivants :

N ^o des essais.	Acide succinique retrouvé.
1	0 gr. 0999
2	0 gr. 0928
3	0 gr. 0814
4	0 gr. 0265

Ces résultats, obtenus par des titrages acidimétriques faits dans les conditions habituelles, c'est-à-dire en employant des liqueurs froides et diluées, montrent que la perte d'acide succinique a été nulle dans le premier cas, tandis qu'elle a augmenté de plus en plus dans les autres où il y avait de la glycérine, et où les conditions étaient de plus en plus favorables à la formation d'éthers glycériques.

Ce qui prouve encore que c'est bien ce phénomène d'éthérification qui a pour conséquence de masquer au titrage une partie de l'acide succinique, c'est que l'on peut retrouver la quantité initiale de cet acide introduit dans l'essai en opérant le titrage de façon à saponifier les éthers produits, comme nous l'indiquerons plus loin, et comme nous l'avons fait dans les trois derniers essais ; les pertes n'ont pas été supérieures à 0 gr. 001, et, par suite, ces éthers ne sont pas sensiblement volatils aux environs de 100°. Comme ils sont parfaitement solubles dans l'éther ordinaire, ils sont donc entraînés avec l'acide succinique pendant l'épuisement de l'extrait des liquides fermentés fait à chaud, et l'on conçoit facilement que l'on puisse, même dans ces conditions, arriver à déterminer la quantité totale d'acide succinique que contiennent ces liquides.

Le procédé que nous allons indiquer permet, en effet, de le

doser avec une assez grande précision; il s'applique seulement aux liquides complètement fermentés ou à peu de chose près, c'est-à-dire ne contenant pas une quantité de sucre supérieure à 1 0/0.

On prend 50 ou 100 c. c. de liquide, suivant sa richesse présumée d'après l'alcool qu'il contient, et on les évapore à sec, au bain-marie bouillant, dans une capsule de porcelaine à fond plat, en présence de 20 grammes de sable blanc, un peu grossier, lavé à l'acide chlorhydrique et calciné, en ayant soin de bien mélanger le sable et l'extrait pendant que celui-ci est encore sirupeux. Par refroidissement, la masse durcit et serait difficile à épuiser, si on ne la laissait pas se ramollir à l'air avant de continuer l'opération.

L'humidité de l'air qu'elle a absorbée au bout de quelques heures permet de la détacher ensuite facilement de la capsule; on l'introduit dans un matras de 250 c. c. environ, en rinçant la capsule avec un peu de sable neuf et d'éther; puis on ajoute dans le matras 100 grammes de grains de plomb n° 4 et 30 c. c. d'éther.

Par l'agitation du plomb, on arrive à un épuisement complet de la masse après trois nouvelles additions d'éther, en décantant chaque fois sur un filtre plat.

On chasse l'éther par distillation, on dissout le résidu avec un peu d'eau bouillante, et on ajoute une liqueur décime de potasse en présence de phénolphthaléine. Lorsque le virage est atteint, on ajoute un excès de potasse correspondant à la moitié environ du volume déjà employé, de façon à faire un nombre entier de c. c., et on procède à la saponification des éthers glycériques. Pour cela, il suffit d'évaporer à sec au bain-marie le liquide contenu dans un vase de Bohême cylindrique, de reprendre ce résidu par l'eau, et de titrer la potasse libre qu'il contient, en ajoutant un excès d'acide sulfurique décime, faisant bouillir un instant pour chasser l'acide carbonique, et déterminant l'excès d'acide par la liqueur décime de potasse. Il est alors facile de calculer le volume de cette dernière liqueur qui correspond à l'acide succinique total contenu dans l'essai.

Le chiffre ainsi obtenu est un peu trop fort; l'erreur est de 1 à 2 décigr. par litre pour les vins ordinaires sains, et correspond à un peu d'acidité volatile qui n'est pas complètement

chassée pendant l'évaporation du vin ; elle se retrouve d'ailleurs, et même plus élevée, dans le procédé Ch. Girard. Pour l'éliminer avec exactitude, il suffit de reprendre le liquide saturé par la potasse, de remettre en liberté l'acidité volatile par l'acide tartrique et de la doser par distillation. Cette méthode donne des résultats très constants pour un même liquide, et tout à fait voisins de ceux que l'on obtient par la méthode d'évaporation dans le vide à laquelle on applique la correction indiquée ; c'est ce que montrent les exemples suivants :

NATURE DU LIQUIDE FERMENTÉ	MODE D'ÉVAPORATION	
	Dans le vide.	Au bain-marie.
Vin blanc	1 ^{er} essai	gr. 1,22
	2 ^e —	1,30
Vin rouge	1 ^{er} essai	1,48
	2 ^e —	1,56
	3 ^e —	1,61

On voit que les différences ne dépassent guère 0 gr. 1 par litre. C'est encore avec ce degré de précision que l'on retrouve l'acide succinique ajouté dans un vin en différentes proportions, ainsi que l'indiquent les chiffres suivants :

NATURE DU LIQUIDE	ACIDE SUCCINIQUE		
	Ajouté par litre.	Total par litre.	Trouvé par litre.
	gr	gr.	gr.
Vin primitif			1,68
— additionné de	0,25	1,93	1,95
— — —	0,50	2,18	2,09
— — —	1,00	2,68	2,63

On a encore vérifié l'exactitude de la méthode par des essais faits sur des liquides synthétiques, constitués par de l'eau de levure alcoolisée contenant de la glycérine, de la crème de

tartre, de l'acide tartrique libre, et des quantités connues d'acide succinique, qui ont été parfaitement retrouvées.

Dans ces expériences sur l'eau de levure, nous avons reconnu que ce liquide, préparé comme on le fait habituellement, ne contient qu'une très petite quantité d'acide succinique libre, tandis qu'il renferme une proportion beaucoup plus importante de cet acide sous forme de sels ; de sorte que, pour doser l'acide succinique total de l'eau de levure, il faut déplacer celui qui est combiné par une addition d'acide tartrique ou bien de bisulfate de potasse.

Mais dans le cas où l'acide succinique se trouve en présence d'acide tartrique libre, il arrive souvent qu'une petite quantité de ce dernier acide est dissoute par l'éther en même temps que le premier, et les résultats seraient par suite trop élevés si on ne les corrigeait pas. Il est facile de le faire très exactement, car on peut déterminer avec précision la quantité d'acide tartrique entraîné en le transformant en crème de tartre par une évaporation de la liqueur provenant du titrage des acides et une addition d'acide acétique et d'alcool. On purifie la crème de tartre par des lavages à l'alcool à 80°, on la dissout dans l'eau chaude, et on titre son acidité par la liqueur décime de potasse ; le double du volume employé correspond à la totalité de l'acide tartrique qu'elle contient, et constitue la correction à apporter au résultat primitif. En étudiant deux eaux de levure différentes à 10 0/0 : la première, de levure pressée de Springer ; la deuxième, de levure de brasserie essorée, nous avons trouvé les chiffres suivants rapportés à 1 litre d'eau de levure.

NATURE DU LIQUIDE	MODES D'ÉVAPORATION			
	DANS LE VIDE		AU BAIN-MARIE	
	N° 1.	N° 2.	N° 1.	N° 2.
Eaux de levure primitives.....	gr. 0,05	gr. 0,08	gr. 0,05	gr. 0,09
Mêmes eaux de levure additionnées de 2 gr. par litre d'acide tartrique	0,46	0,50	0,49	0,43
Mêmes eaux de levure additionnées de 4 gr. par litre de bisulfate de potasse.....	0,58	»	0,55	0,46

L'acide succinique extrait de ces eaux de levure était parfaitement cristallisé, et ne laissait aucun doute sur sa pureté. On voit que les différentes marches suivies pour obtenir les poids d'acide succinique total ont une valeur à peu près égale, et que ces poids sont peu éloignés les uns des autres pour les deux eaux de levure considérées: ils établissent par conséquent que la levure essorée, formant une pâte assez consistante, contient environ 0,5 0/0 de son poids d'acide succinique, dont des traces seulement sont à l'état libre. C'est cette petite quantité d'acide libre qui donne à l'eau de levure sa très faible réaction acide.

Cette étude de l'eau de levure nous a paru intéressante parce que ce liquide est souvent employé pour constituer des liquides fermentescibles acidulés ou non par l'acide tartrique.

III

Nous avons ensuite considéré le cas des liquides incomplètement fermentés, contenant des quantités de sucre supérieures à 10/0, pour lesquels la méthode précédente ne peut être appliquée directement; le sucre, en trop forte proportion, gêne, en effet, l'extraction complète de l'acide succinique par l'éther. On peut tourner assez facilement la difficulté de la manière suivante :

On évapore le liquide à consistance sirupeuse; on y ajoute 10 à 20 c. c. d'alcool suivant la quantité de sucre contenue dans l'essai, et du plomb comme précédemment. Puis on introduit dans le matras 50 c. c. d'éther, par petites fractions au début, en agitant vivement le plomb pour favoriser le contact de l'éther avec le liquide sirupeux qui se précipite sous forme d'émulsion blanche. Après repos de quelques instants, on décante l'éther sur un filtre, on ajoute de nouveau un peu d'alcool pour redissoudre le sirop, et on recommence sa précipitation par l'éther. Avec 3 à 4 lavages de ce genre, on a enlevé tout l'acide succinique et d'autres éléments du liquide fermenté. Le liquide d'extraction est alors distillé pour éliminer l'éther, puis le résidu alcoolique, introduit dans une capsule à fond plat avec du sable, est traité comme s'il s'agissait d'un liquide non sucré, c'est-à-dire qu'on l'évapore à sec au bain-marie, et qu'on l'épuise par l'éther seul en présence de plomb.

En procédant ainsi avec des liquides sucrés à 100 gr. par

litre contenant des quantités connues d'acide succinique, nous avons trouvé les résultats du tableau ci-dessous.

ACIDE SUCCINIQUE		ACIDE SUCCINIQUE	
Employé.	Calculé par litre.	Retrouvé.	Calculé par litre.
gr.	gr.	gr.	gr.
0,0125	0,250	0,0126	0,252
0,0250	0,500	0,0242	0,484
0,0500	1,000	0,0471	0,942
0,1000	2,000	0,0966	1,932

Nous avons aussi opéré sur des vins de richesse connue en acide succinique, auxquels nous avions ajouté, par 50 c. c. de vin primitif, jusqu'à 5 grammes de sucre, soit 100 grammes par litre, et nous avons obtenu les chiffres suivants rapportés à 1 litre de vin.

	Vins primitifs.]	Vins sucrés.
Vin rouge.....	1 ^{er} ,74	1 ^{er} ,80
Vin blanc	1 ^{er} ,37	1 ^{er} ,41
Vin blanc	1 ^{er} ,48	1 ^{er} ,44

Les résultats sont, par suite, très satisfaisants, et la présence du sucre dans les liquides fermentés ne peut empêcher de connaître exactement la quantité d'acide succinique qu'ils contiennent.

A l'aide des deux méthodes que nous venous d'indiquer, on pourra donc procéder avec une exactitude suffisante au dosage de l'acide succinique dans les liquides complètement ou incomplètement fermentés, mais provenant toujours d'une fermentation alcoolique pure. Elles sont applicables, par exemple, à tous les vins normaux plus ou moins sucrés; mais pour ceux qui ont subi l'action des fermentes d'altération, lesquels, comme on sait, peuvent donner naissance à de l'acide lactique, soluble dans l'éther comme l'acide succinique, il est nécessaire, après l'extraction des deux acides, de procéder à leur séparation par les méthodes connues.

LA SACCHARIFICATION DE L'AMIDON

PAR M. POTTEVIN.

De la discussion à laquelle M. Duclaux a soumis, dans ces Annales et dans le tome II de son *Traité de Microbiologie*, les théories proposées au sujet de la saccharification de l'amidon, on peut conclure, je crois, que les savants ne sont pas d'accord sur ce point, et que la principale difficulté vient de ce qu'on ne sait pas bien ce que sont la dextrine ou les dextrines. Les seules notions qui semblent bien établies à leur sujet sont les suivantes :

Les dextrines ont même composition centésimale que l'amidon ; elles possèdent un pouvoir rotatoire droit égal pour toutes et égal à celui de l'amidon ; elles sont dénuées de pouvoir réducteur ; pour toutes celles qu'on a pu soumettre avec sécurité à l'étude cryoscopique, le poids moléculaire est le même, il correspond à la formule $(C^{12}H^{20}O^{10})^{20}$. Traitées par la diastase, les diverses dextrines fournissent, toutes choses égales d'ailleurs, des quantités variables de maltose ; ce caractère d'être plus ou moins facilement transformées en sucre est l'élément différentiel qui sert de base aux classifications établies par O'Sullivan et par Brown et Héron.

Déjà, dans leur mémoire de 1885, Brown et Morris ont montré que si on prend l'une quelconque des dextrines regardées primitivement par eux-mêmes comme des produits définis, on peut, au moyen de précipitations fractionnées à l'alcool, la séparer en plusieurs portions qui, traitées par la diastase, se comportent de façon différente ; ils concluent que tous les produits obtenus par eux ou par leurs devanciers sont des mélanges constitués par l'union en proportions variables de huit dextrines dont ils prévoient théoriquement la formation, mais celles-ci elles-même n'ont plus dès lors qu'un caractère hypothétique, puisque en aucun cas elles n'ont été effectivement isolées.

Je vais entreprendre l'étude des dextrines en faisant abstraction de toute conception théorique ; pour les séparer j'emploierai les précipitations fractionnées à l'alcool. Afin d'obtenir des

résultats toujours comparables, j'ai adopté une technique constante : la solution aqueuse était concentrée au bain-marie, refroidie, additionnée d'alcool de façon que le titre alcoolique du mélange atteigne le chiffre voulu; je laissais déposer, je filtrais, le précipité resté sur le filtre était repris par l'eau, précipité à nouveau par l'alcool à la même concentration; l'opération était répétée jusqu'à ce qu'une nouvelle précipitation ne laisse plus de résidu dans les eaux-mères; les liquides alcooliques provenant des précipitations successives étaient réunis, concentrés et soumis après dosage de la matière dissoute aux précipitations ultérieures par l'alcool à dose plus élevée; au début de chaque fractionnement, la concentration du liquide aqueux était poussée jusqu'à un point calculé de façon que la teneur en substance dissoute du liquide aquo-alcoolique au sein duquel se forme le précipité fut voisine de 5 0/0; l'expérience m'a montré, en effet, que pour un même mélange, la proportion de matière qui reste en solution dans l'alcool à un titre donné n'était pas indépendante de la dilution. Les produits de la transformation de l'amidon seront ainsi séparés en plusieurs portions, l'une soluble dans l'alcool à 25 0/0, insoluble dans l'alcool à 30 0/0, l'autre soluble dans l'alcool à 30 0/0, insoluble dans l'alcool à 40 0/0 et ainsi de suite : nous aurons à nous demander quelle est la signification des distinctions ainsi établies.

50 grammes de féculle de pomme de terre, gélatinisés dans 10 litres d'eau, ont été traités à la température de 79-80° par une petite quantité d'amylase (toutes les fois que j'emploierai le terme « amylase », il s'agira d'amylase du malt précipitée par l'alcool), il ne s'est pas formé de sucre en quantité appréciable : les précipitations fractionnées à l'alcool ont donné :

Titre alcoolique du liquide.	Poids de subst. insoluble dans le mélange aquo-alcoolique.	
	Ce poids est rapporté à 100 c. c. de subst. totale mise en œuvre.	
30		4,2
35		20,6
40		63,5
45		71,3
50		78,1
60		88,4
70		92,7
80		96,2

Les dextrines qui restent dissoutes dans l'alcool à 70 0/0 constituent, après séchage, une poudre blanche se dissolvant facilement et abondamment dans l'eau froide ; l'iode ajouté à leurs

solutions y produit à peu près la même teinte que dans l'eau pure, ce sont des achroodextrines.

Les dextrines qui restent en solution dans l'alcool à 25 0/0, mais sont précipitées par l'alcool à 40 0/0, constituent une poudre blanche se dissolvant peu et difficilement dans l'eau froide, plus soluble dans l'eau chaude; leurs solutions froides sont toujours opalescentes, l'iode ajouté peu à peu produit une coloration d'un bleu pur; ce sont des amylodextrines.

Les dextrines qui sont restées dissoutes dans l'alcool à 55 0/0, mais ont été précipitées par l'alcool à 65 0/0, constituent une substance blanche se dissolvant facilement dans l'eau froide; les solutions sont limpides et l'iode y produit une coloration rouge; si l'iode est ajouté peu à peu, la teinte d'abord rouge pelure d'oignon vire au rouge foncé sans donner à aucun moment de nuance bleue ou violette; ce sont des érythrodextrines.

Pour certains auteurs, Salomon, Musculus, en particulier, les érythrodextrines n'auraient pas d'existence propre. Salomon explique la coloration rouge que produit l'iode par ce fait que l'amylodextrine, qui se colore en bleu lorsqu'elle est en solution aqueuse, se colorerait en rouge lorsqu'elle se trouve en présence d'une certaine quantité d'achroodextrine; c'est là une hypothèse à l'appui de laquelle son auteur n'apporte aucun fait précis. J'ai essayé d'obtenir un mélange colorable en rouge par l'union d'amylodextrines et d'achroodextrines: en vain j'ai fait varier les proportions des substances et leur état, en prenant les amylodextrines les plus solubles dans l'alcool, je n'ai jamais obtenu que des mélanges colorables en bleu. Pour Musculus, l'amylodextrine se colorerait en bleu lorsqu'elle est en solution concentrée, et en rouge lorsqu'elle est en solution étendue. En lisant avec attention le mémoire de Musculus, on voit qu'il donne arbitrairement le nom d'amidon soluble ou amylodextrine à un mélange complexe représentant le produit à peu près brut d'une saccharification peu avancée et où dominent les érythrodextrines. Si on prend l'amylodextrine bien isolée par les précipitations fractionnées à l'alcool, elle donne, quelle que soit la dilution, exclusivement du bleu: en ajoutant l'iode peu à peu on voit la teinte se foncer et virer au bleu noir, mais sans jamais donner de rouge ni de violet; d'autre part, les érythrodextrines délayées dans très peu d'eau donnent un liquide que l'iode colore exclu-

sivement en rouge. Si, au lieu de prendre les amyloextrines ou les érythrodextrines isolées, on prend les produits de la saccharification *in toto* après leur avoir fait subir le traitement sommaire de *Musculus*, qui les débarrasse des portions d'amidon non liquéfierées et des corps les plus solubles dans l'eau, on constate que la teinte varie suivant la proportion d'iode ajoutée : avec un peu d'iode elle est bleue, avec un excès d'iode elle vire au violet et au rouge. Sur des liquides contenant plus de 1 p. 100 de matière dissoute, le virage que je viens de signaler est difficile à saisir, il devient très net sur des dilutions à 1 p. 1000. L'expérience est facile à réaliser en faisant avec un même liquide des dilutions telles que la teneur en substance dissoute aille en décroissant à partir de 1 p. 1000 : la même quantité d'iode ajoutée à un même volume de ces dilutions donne une coloration bleue dans les premières, rouge dans les dernières ; cette méthode des dilutions est très sensible, elle me fournira un criterium de pureté de l'amyloextrine, celle-ci sera déclarée pure quand elle ne donnera jamais que des teintes bleues. Les variations de teinte que nous venons d'observer tiennent sans doute à l'inégale affinité pour l'iode de la substance colorable en bleu et de la substance colorable en rouge ; dans un mélange, c'est l'amyloextrine qui se teint d'abord ; la dilution modifie ces affinités au profit de l'érythrodextrine, si bien qu'on observe des changements analogues si on dilue, comme le faisait *Musculus*, le mélange d'iode et de dextrines, la coloration d'abord bleue vire au rouge.

L'érythrodextrine a donc une existence propre au même titre que l'amyloextrine et que l'achroodextrine, nous avons là trois substances faciles à isoler et à caractériser. J'ai volontairement laissé de côté les dextrines intermédiaires qui donnent à l'iode des teintes violettes : les teintes varient pour une même dextrine avec la proportion d'iode ; ceci éveille tout de suite l'idée d'un mélange et j'ai tenu à m'attacher tout d'abord aux substances que la réaction de l'iode pouvait faire considérer comme pures et homogènes : le sont-elles en effet ? Voyons d'abord l'amyloextrine.

Dutrochet avait déjà constaté que l'empois d'amidon ne laisse rien diffuser au travers d'une cloison de porcelaine poreuse, il ne laisse à peu près rien passer non plus à la bougie

Chamberland ; si on essaie de la même façon l'amylodextrine obtenue par l'action ménagée de l'amylase, on constate qu'une partie traverse la bougie, tandis que l'autre est retenue ; si l'action de l'amylase a été prolongée davantage, l'amylodextrine passe intégralement.

1 litre d'empois à 20/0 de fécale a été traité à 79-80° par 0,05 d'amylase précipitée : le liquide concentré soumis aux précipitations fractionnées par l'alcool donne :

Alcool 0/0.	Poids de subst. précipitée 0/0.
— 30	— 42,2
40	81,5

La portion soluble dans l'alcool à 30 0/0, mais précipitée par l'alcool à 40 0/0, reprise par l'eau, fournit une solution qui, filtrée sur une bougie Chamberland, donne :

Substancé dissoute en 100 c. c. avant la filtration...	2,4
— — — après la filtration...	0,85

Le liquide essayé à l'iode par la méthode des dilutions avant et après la filtration donne, dans les deux cas, des teintes d'un bleu pur ; l'amylodextrine a donc traversé la bougie, mais pas intégralement, les deux tiers environ ont été retenus.

Une deuxième opération a été conduite comme la précédente, mais le traitement par la diastase a été répété quatre fois, les précipitations à l'alcool donnent :

Alcool 0/0.	Substance précipitée p. 100.
— 30	— 5,6
40	59,4

La dextrine précipitée par l'alcool à 40 0/0 est reprise par l'eau ; la solution filtrée à la bougie donne :

Substancé dissoute en 100 c. c. avant la filtration...	2,9
— — — après la filtration...	2,5

L'iode, après comme avant filtration, indique la présence d'amylodextrine pure : celle-ci est passée presque tout entière au travers du filtre.

En étudiant la filtration au travers des parois de porcelaine, nous trouvons donc qu'il y a amylodextrine et amylodextrine : des considérations d'un autre ordre vont affirmer et préciser cette notion.

Une transformation faite dans les conditions des expériences précédentes a fourni un liquide qui, par les précipitations fractionnées à l'alcool, donne :

Alcool 0/0.	Substance précipitée p. 100.
20	8,1
30	44,2
35	68,3
40	82,7
50	92,1
60	96,2

Considérons les deux fractions séparées, l'une α entre 20 et 30 0/0 d'alcool, l'autre β entre 35 et 40.

La dextrine α , dissoute dans la proportion de 1 0/0, donne une solution fortement opalescente, qui devient limpide à chaud, mais reprend son opalescence en se refroidissant, qui ne passe que très péniblement au travers de la bougie et en sort privée de la presque totalité de sa substance dissoute, qui par l'iode se colore en bleu intense : si à la solution colorée par l'iode on ajoute une petite quantité d'un sel neutre (1 0/0 de chlorure de sodium par exemple) ou de l'une des nombreuses substances signalées par Payen comme capables de précipiter l'iodure d'amidon, on voit l'iodure bleu se rassembler en quelques heures au fond du vase et se rétracter ensuite à la façon d'un coagulum de caseïne ; il laisse au-dessus de lui un liquide limpide, incolore et qui, si la quantité d'iode introduite est suffisante, ne contient plus d'amylodextrine.

L'amylodextrine α se comporte donc comme l'empois non traité par la diastase, il faut seulement une dose de sel un peu plus élevée pour produire la coagulation de l'iodure.

La portion β donne des solutions qui, limpides à chaud, le restent à froid si elles ne sont pas trop concentrées ; ces solutions traversent la bougie sans modification notable, elles se colorent exclusivement en bleu par l'iode. Mais l'addition du chlorure de sodium, même à la dose de 20 0/0, ne détermine la formation d'aucun précipité.

Je n'ai cité que quelques expériences choisies parmi beaucoup d'autres, toutes conduisent aux mêmes conclusions : il n'y a pas qu'une amylodextrine. Parmi les substances colorables en

bleu que précipite l'alcool faible, les unes donnent des solutions laiteuses, qui ne traversent pas les parois de porcelaine, qui fournissent un iodure facilement coagulable par les sels neutres et se rapprochent ainsi de l'empois ; les autres donnent des solutions qui filtrent sans altération et fournissent un iodure incoagulable, elles se rapprochent des érythrodextrines.

Après ce que nous venons d'apprendre, nous sommes portés à penser qu'il n'y a pas plus d'homogénéité dans les groupes de l'érythrodextrine et de l'achroodextrine que dans celui de l'amylodextrine ; pour éclaircir ce point, nous allons étudier, au point de vue de leur résistance à l'amylase, les différentes fractions isolées par l'alcool, depuis les amylodextrines jusqu'aux achroodextrines solubles dans l'alcool fort.

L'expérience suivante a été faite avec une dextrine incolorable par l'iode isolée des produits fournis par une saccharification déjà avancée, ceux-ci comprenaient :

Maltose	60,2
Dextrine	39,8

La plus grande partie du sucre est éliminée par des précipitations dans l'alcool à 95 0/0, et il reste un mélange de :

Maltose	7,3
Dextrine	92,7

Les fractionnements par l'alcool donnent :

La portion A précipitée par l'alcool à 60 0/0 contient 22,4 de dextrine et 0,6 de maltose.	
— B sol. dans alc. à 60 Préc. par alc. à 70 —	26,3
— C — 70 — 80 —	32,3
— D — 80 —	9,2
	0,9
	3,2
	2,3

Ces diverses fractions sont dissoutes dans l'eau et les solutions sont additionnées de maltose, de façon que chacune d'elles contienne dans 100 c. c. :

Maltose	4,2
Dextrine	5,0

Toutes ces solutions sont traitées simultanément et dans les mêmes conditions par la diastase à 63°. Les quantités de maltose formé pour 100 de dextrine mise en œuvre ont été :

Fraction A	20,5
— B	37,6
— C	75,3
— D	97,2

La dextrine totale traitée dans les mêmes conditions par la diastase a donné 53,7 0/0 de maltose, au lieu de 52,8 qu'a donné l'ensemble des fractions.

Notre achroodextrine n'était donc pas homogène, et il est bien clair, en outre, que les divisions que nous avons établies sont arbitraires et qu'il n'y a aucune raison de penser que les parties soient plus homogènes que le tout.

Une saccharification faite à 78° a fourni un mélange contenant :

Maltose	4,5
Dextrine.....	95,5

Ce mélange a été fractionné par l'alcool, et j'ai traité dans les mêmes conditions, par la diastase à 63°, d'une part les diverses fractions redissoutes dans l'eau, d'autre part une partie du mélange primitif. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

La portion précipitée par l'alcool à 35 0/0 représente 5,4 0/0 de la masse totale, elle a donné.....	20,1 0/0 de son poids en maltose.
La port. sol. en alc. à 35 0/0 pré- cipitée par alc. à	40 — 35,3 — 50,5 —
— 40 — 50 — 29,7 — 61,4 —	
— 50 — 60 — 14,3 — 75,6 —	
— 60 — 70 — 6,8 — 89,5 —	
— 70 — 80 — 3,9 — 98,3 —	

La dextrine du mélange primitif a donné 57,8 0/0 de sucre au lieu de 55,4 qu'a donné celle de l'ensemble des fractions.

L'expérience précédente embrasse toute la série des dextrines, elle montre que la résistance à la diastase n'est pas plus constante dans la région des érythrodextrines que dans celle des achroo ou des amylodextrines, et que, dans chaque solution amylacée en voie de saccharification, se trouve une série de corps dont toutes les propriétés connues varient d'une façon graduelle : la chaîne ainsi formée va depuis les amylodextrines très voisines encore de l'état d'embois jusqu'aux achroodextrines solubles dans l'alcool fort, facilement et intégralement transformables en maltose.

A quel ordre de faits physiques ou chimiques convient-il de rattacher les différences relevées entre les dextrines? Les expériences de Brown et Morris prouvent que, au moins dans les érythrodextrines et les achroodextrines, le poids moléculaire reste invariable et voisin de 6,000.

L'amylodextrine ou plus exactement « l'amidon soluble » semblerait posséder un poids moléculaire beaucoup plus élevé. il serait égal à 18,000 d'après Lintner, à 24,000 d'après Brown et Morris. Mais les savants anglais font observer eux-mêmes qu'ici la cryoscopie perd toute autorité; ils disent en effet :

« Bien que différentes expériences aient donné des résultats concordants, d'après lesquels le poids moléculaire de l'amidon serait compris entre 20,000 et 30,000, les erreurs d'expérience sont si importantes relativement à la valeur absolue des nombres observés qu'il est impossible d'accorder quelque confiance aux résultats, quelque soin qu'on ait apporté dans la conduite des expériences. » De mon côté, je me suis proposé de déterminer les points de congélation de solutions d'amylodextrine faites avec les produits isolés par l'alcool. Les amyloextrines les plus solubles dans l'alcool, celles qui passent au travers de la bougie Chamberland et dont l'iode n'est pas coagulé par NaCl donnent des solutions qui peuvent être congelées à la condition que la concentration ne dépasse pas 2 ou 3 0/0; pour des concentrations plus fortes une partie de la substance dissoute se sépare à 0° et ne se redissout pas quand la masse revient à la température ordinaire; avec des solutions à 2 0/0 l'abaissement du point de congélation est encore trop au-dessous des erreurs d'expérience pour que le poids moléculaire auquel il conduirait puisse être accepté, même comme une indication. Les amyloextrines les moins solubles dans l'alcool sont précipitées de leurs solutions, même très étendues, dès qu'on les soumet à la congélation, elles se prêtent moins encore que les autres à des déterminations cryoscopiques. En réalité donc, relativement à la grosseur de la molécule d'amylodextrine, la cryoscopie ne dit rien et je montrerai plus loin que le phénomène qui conduit d'une achroodextrine à l'autre n'est que la continuation de celui qui conduit de l'amidon à l'amylodextrine, de celle-ci à l'érythrodextrine et de cette dernière à l'achroodextrine, je ne vois aucune raison d'admettre qu'il se produit des dédoublements moléculaires au début, alors que sûrement il ne s'en produit pas à la fin.

Relativement à la coloration par l'iode, les expériences de Payen ont montré que les propriétés de ne pas se colorer par l'iode, ou de donner avec ce réactif une teinte déterminée, sont liées à des changements d'état qui ne dépassent pas ceux que peut amener une modification dans le degré de cohésion de la substance.

Nous savons aussi par des expériences de Payen que si les grains d'amidon sont très petits, l'empois qu'ils donnent fournit

un iodure difficile à coaguler; celui-ci, au contraire, se précipite facilement s'il provient d'amidon à grains très gros (on suppose que dans les deux cas le même poids d'amidon a été gélatinisé dans le même volume d'eau). La différence tient évidemment à la façon plus ou moins parfaite dont la substance amylacée se trouve distendue au sein du liquide.

La différence des résistances à la diastase peut aussi être rapportée à des différences d'ordre physique, comme je le montrerai plus loin.

Enfin le fait d'être précipitables par l'alcool à une concentration plus ou moins élevée et de traverser plus ou moins facilement les parois de porcelaine n'éveille pas l'idée d'un changement survenu dans la constitution de la molécule chimique.

Si nous mettons toutes les considérations précédentes en regard du fait que pour tous les produits de la saccharification intermédiaires entre l'amidon et le sucre, la composition centésimale et le pouvoir rotatoire sont constants, nous sommes autorisés à conclure que les différences observées ne dépassent pas celles que peut expliquer un changement d'état physique, modifiant les relations des molécules entre elles, mais laissant intact leur édifice. Nous allons voir cette conclusion préliminaire s'affirmer en étudiant la dextrinisation.

II

DEXTRINISATION

On admet aujourd'hui que le dédoublement moléculaire qui constituerait l'acte même de la saccharification serait précédé par la liquéfaction de l'empois, celle-ci se réduisant à la disparition de l'état muqueux; l'indépendance de la liquéfaction et de la saccharification a été acceptée parce que, manifestement, on peut obtenir la première en dehors de la seconde, et que si on se borne à apprécier le changement d'aspect de l'empois, le phénomène prend une allure très nette: aux températures élevées où la saccharification est pénible, la liquéfaction se produit plus rapidement qu'aux températures basses et elle n'est accompagnée d'aucune formation de sucre. Mais si on y regarde de plus près, les choses sont loin de paraître aussi simples. Toutes les parties

d'un empois liquéfié ne sont pas dans le même état : les unes sont à peine décoagulées; les autres sont au contraire loin de leur état primitif; entre celles-ci et les érythrodextrines, nous ne savons établir aucune démarcation précise, pas plus, d'ailleurs, qu'entre les érythrodextrines et les achroodextrines : où s'arrête la liquéfaction proprement dite? où commence la dextrinisation? La théorie de Musculus répond : la dextrinisation commence avec la production du sucre. Je vais démontrer qu'il n'en est rien, et que l'on peut aller de l'amidon à l'achroodextrine par un phénomène continu, indépendant de toute formation de sucre à la fin comme au début.

Suivons la marche de la dextrinisation par les précipitations fractionnées à l'alcool. En opérant à la température de 80°, voisine de celle où la diastase cesse d'agir, j'ai pu obtenir une dextrinisation très avancée sans qu'il se forme de sucre; il suffit pour cela de maintenir le liquide diastasifère à 80° pendant un temps convenable avant de l'ajouter à l'empois; lorsqu'on opère la transformation en ajoutant le liquide diastasifère à l'empois aussitôt que l'un et l'autre ont atteint la température de l'expérience, on observe toujours la production d'un peu de sucre, mais celle-ci est limitée aux premiers instants de la réaction, elle est arrêtée que la dextrinisation se poursuit encore.

Les expériences suivantes ont été faites en traitant à 80° un certain volume d'empois de féculle (5 grammes de féculle de pomme de terre dans un litre d'eau) par des affusions successives d'extrait de malt; celui-ci était maintenu au préalable pendant 5 minutes à 80° et ajouté chaque fois dans la proportion de 4 c. c. pour 100 c. c. d'empois, les affusions étaient faites de 10 minutes en 10 minutes; le liquide était ensuite filtré, concentré au bain-marie et soumis aux précipitations fractionnées par l'alcool; dans la solution aqueuse concentrée, j'ai dosé le sucre par la liqueur de Fehling, la quantité trouvée a été rigoureusement égale à celle qu'avait apportée l'extrait de malt.

I. Une seule affusion d'extrait de malt a donné :

Matière totale en solution	18,4
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0 ...	4,0

La substance soluble dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

II. Sept affusions d'extrait de malt ont donné :

Matière totale en solution	47,44
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0 ...	3,00

La substance soluble dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

L'expérience suivante a été faite avec une solution d'amylase précipitée par l'alcool.

0^{gr}.1 d'amylase était dissous dans 100 c. c. d'eau et chaque affusion se faisait à raison de 20 c. c. de solution pour 1 litre d'empois : les précipitations à l'alcool ont donné :

Matière totale dissoute.....	43,8
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0 après 2 affus.	4,3
—	2,0
—	2,4
—	2,5

Le liquide à la fin de l'opération ne contenait pas de sucre.

Il est donc parfaitement établi que la production des dextrines est indépendante de la production de sucre ; nous pouvons faire un pas de plus et prouver que la saccharification et la dextrinisation correspondent à deux propriétés distinctes et dissociables de l'amylase ; je vais montrer, en effet, que par l'action ménagée de la chaleur on peut, en partant de l'extrait de malt ou de la solution d'amylase, obtenir un liquide qui dextrinise encore, mais qui ne saccharifie plus.

J'ai chauffé à 80° pendant des temps variables chaque fois 50 c. c. d'extrait de malt qui étaient ensuite versés rapidement dans 100 c. c. d'empois à 3 0/0 de féculle froid, la température du mélange tombait au voisinage de 50° ; je plaçais celui-ci dans un bain-marie à 60° et je laissais la transformation s'achever.

Dans les tableaux qui suivent, les nombres de la colonne A indiquent la proportion de sucre formé rapportée à 100 de matière dissoute, ceux de la colonne B la quantité de dextrine soluble dans l'alcool à 70 0/0.

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
5	80	20
10	53	40
20	21	30
25	12	24
30	2	14
35	0	10
40	0	6
45	Liquéfaction incomplète.	

Après un chauffage de 35 minutes le pouvoir saccharifiant est détruit, tandis que le pouvoir dextrinisant persiste : le temps de chauffe au bout duquel ce dédoublement des propriétés est obtenu varie, du reste, avec la nature de l'extrait de malt employé ; un extrait traité dans les conditions de l'expérience précédente a donné :

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
5	67	33
10	20	50
15	4	40
20	0	5

dans ce cas le pouvoir saccharifiant a disparu dès la quinzième minute; toutes les fois qu'on voudra répéter l'expérience à coup sûr, il faudra faire des essais en série.

Les expériences suivantes ont été faites avec de l'amylase précipitée :

I. La solution d'amylase maintenue pendant le temps voulu à 80° était versée dans un volume égal d'empois à 3 0/0 de fécale froid, le mélange était ensuite maintenu à 60° jusqu'à ce que la transformation fût arrivée à son terme.

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
1	63	27
2	25	75
5	4	30
10	0	45
15	Liquéfaction incomplète.	

II. 1,500 c. c. d'empois à 2 0/0 de fécale ont été traités à 60° par huit affusions de 150 c. c. de la solution diastasique qui a servi pour l'expérience précédente, la diastase était préalablement chauffée pendant 10 minutes à 80°, les affusions étaient faites d'heure en heure : le mélange soumis aux précipitations fractionnées à l'alcool a donné :

Alcool 0/0:	Poids 0/0 de substance qui reste en solution.		
	Après 2 affus.	Après 4 affus.	Après 8 affus.
40	»	»	88,4
60	»	»	40,2
70	40,3	15,2	17,8

Il n'y a pas eu production de sucre : après les huit affusions la substance qui reste en solution dans l'alcool à 60 0/0 se colore en rouge par l'iode, celle qui reste en solution dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

Il est aujourd'hui admis que les diverses dextrines ont un pouvoir réducteur nul et un pouvoir rotatoire égal à celui de l'amidon; cette notion résultait des recherches de Brown et Héron, de O'Sullivan, de Effront; elle se déduit bien plus simplement et sans contestation possible des expériences suivantes :

Je prépare un empois en précipitant la fécale de pomme de terre (1 à 2 gr. pour 100 c. c. d'eau), dans l'eau portée à 95°, l'amidon se gélifie aussitôt, je le maintiens à 95° pendant 1/2 heure environ, puis je le porte à 120°

dans un autoclave pendant 1 heure ; l'empois ainsi obtenu est très légèrement opalescent et suffisamment transparent pour être examiné sans peine au polarimètre dans un tube de deux décimètres : traité à 80° par la diastase ou à 60° par la diastase chauffée, cet empois est transformé partiellement en dextrine sans que son pouvoir rotatoire varie.

L'expérience suivante a été faite en traitant à 60° par l'extrait de malt chauffé à 80° un empois transparent à 10/0.

Rotation α_D avant le traitement.....	30° 38'
— — — après — — —	30° 38'

Les précipitations fractionnées à l'alcool ont isolé trois portions.

Portion *a*. Précipitée par l'alcool à 60 0/0, la solution se colore en bleu par un peu d'iode, en violet brun par un excès.

Portion *b*. Reste en solution dans l'alcool à 60 0/0, est précipitée par l'alcool à 70 0/0 ; les solutions par des quantités croissantes d'iode donnent d'abord un rouge clair, puis un rouge brun foncé.

Portion *c*. Reste en solution dans l'alcool à 70 0/0. L'iode ajouté aux solutions produit à peu près la même teinte que dans l'eau pure.

Il n'y a pas eu production de sucre réducteur.

Les poids respectifs des portions *a*, *b*, *c* ont été :

<i>a</i>	10,6
<i>b</i>	2,7
<i>c</i>	2,9

Les substances ainsi isolées, dissoutes dans l'eau à raison de 3 gr. pour 100 c. c., traitées à 60° par l'extrait de malt frais, ont donné en maltose pour 100 de dextrine :

<i>a</i>	71
<i>b</i>	82
<i>c</i>	95

L'expérience précédente prouve de la façon la plus nette que les produits intermédiaires entre l'amidon et le maltose ont un pouvoir rotatoire égal à celui que possède l'amidon dans le granule simplement distendu par l'eau.

Le procédé que je viens d'indiquer pour obtenir des empois transparents, et susceptibles d'être examinés au polarimètre dans des conditions de précision suffisante, fournit un moyen de comparer entre eux, au point de vue du pouvoir rotatoire, les amidons d'origine différente, c'est une étude que je me propose de faire ultérieurement.

Il aurait été intéressant de rattacher le dédoublement de l'amylase aux phénomènes d'ordre connu qui peuvent se passer au sein du liquide diastasifère chauffé. Lorsqu'on chauffe l'extrait de malt, on voit se former un coagulum qui bientôt se dépose, laissant au-dessus de lui un liquide limpide ; la diastase peut

être soit coagulée, soit entraînée par collage sur le coagulum : je me suis proposé de suivre comparativement la marche de la coagulation et celle de la destruction de la diastase.

Pour chaque essai, 200 c. c. d'un même extrait de malt ont été maintenus à 80° pendant un temps déterminé, rapidement refroidis, abandonnés à eux-mêmes pour laisser le coagulum se déposer, filtrés ; je pesais le coagulum recueilli sur un filtre et séché, et je mesurais l'activité saccharifiante du liquide filtré : celle-ci était évaluée d'après la quantité de sucre qui prenait naissance lorsque je faisais agir à 60°, 20 c. c. du liquide sur 100 c. c. d'un empois à 3 0/0 de féculle ; les nombres du tableau ci-dessous expriment les activités observées en supposant égale à 100 l'activité de l'extrait de malt avant le chauffage.

Temps de chauffage en min.	Poids du coagulum.	Activité saccharifiante.
5	0,42	90,5
10	0,51	42,3
20	0,51	10,1
30	0,51	0

Nous voyons que la plus grande partie de la substance coagulable est précipitée alors que la diastase est peu attaquée : d'autre part, lorsqu'on chauffe une solution d'amylase, celle-ci est détruite sans qu'il se forme de précipité appréciable : il ne semble donc pas que le rôle important dans la destruction de la diastase doive être attribué aux phénomènes de coagulation.

Pour tous les phénomènes de l'ordre de ceux qui nous occupent, on doit nécessairement songer aux oxydations, auxquelles les diastases sont si sensibles et dont l'importance biologique devient chaque jour plus apparente. Déjà aux températures inférieures à 70° les solutions d'amylase perdent peu à peu leur activité, et l'oxygène intervient dans cette altération d'une façon non douteuse.

Un même extrait de malt a été réparti d'une-part dans des tubes qui ont été fermés à la lampe vides d'air, d'autre part dans des tubes semblables qu'on a placés à côté des premiers dans un bain-marie réglé à 65° et qui ont été parcourus pendant toute la durée de l'expérience par un courant d'oxygène pur passant bulle à bulle ; on avait ajouté dans chaque tube un dix-millième d'aldéhyde formique pour se mettre à l'abri des microbes. Le pouvoir saccharifiant a été mesuré par la quantité de sucre obtenu en traitant à 60° pendant 1/4 d'heure, 100 c. c. d'empois à 3 0/0 de féculle par 10 c. c. de l'extrait à essayer.

Temps de chauffe en heures.	Série vide.	Série oxygénée.
1	78,2	75,2

5	75,4	36,4
10	56,4	Liquéfact. incomp.
15	30,4	
20	Liquéf. incomp.	
25	Pas de liquéf.	

Aux températures plus élevées les choses se passent de même, seulement la destruction de la diastase est plus rapide; l'expérience suivante a été faite dans les mêmes conditions que celle qui précède mais avec de l'amylase précipitée et à la température de 78-80.

Temps de chauffe en min.	Série vide.	Série oxygénée.
1	78,2	64,5
2	30,4	49,2
5	42,5	0
10	7,0	0
15	0	0

Aux températures supérieures à 80° la destruction de la diastase est presque instantanée et j'ai toujours vu l'extrait de malt devenir incapable de liquéfier l'embois après un séjour de quelques secondes à 85°.

En résumé, dans les modifications que subit l'amylase aux températures élevées, les phénomènes de coagulation paraissent jouer un rôle secondaire, les phénomènes d'oxydation, au contraire, paraissent jouer un rôle important; quoi qu'il en soit de l'importance relative de ces deux ordres d'influences il résulte de ce que nous avons appris au cours de ce chapitre :

1^o Que la transformation qui conduit de l'amidon à la dextrine et celle qui conduit de la dextrine au sucre sont deux phénomènes distincts;

2^o Que chacun de ces deux phénomènes correspond à une propriété spéciale de l'amylase, ce qui revient à dire que celle-ci est un mélange de deux diastases, l'une dextrinisaute, l'autre saccharifiante.

III

LA SACCHARIFICATION

Ce que j'ai dit au chapitre précédent prouve que la théorie de la saccharification, telle qu'elle est actuellement admise, ne

saurait être conservée : il faut en revenir aux conceptions de Payen qui admettait, bien qu'il ne fût pas arrivé à les isoler en fait, deux phénomènes successifs et indépendants. Mais ce point une fois acquis, nous nous trouvons dans la nécessité de chercher une explication nouvelle pour tout un ensemble de faits qui ont servi de fondement à la théorie de Museulus, et que n'expliquait pas la théorie de Payen telle que celui-ci l'avait formulée.

Si on suit la marche de la production du sucre aux températures supérieures à 50°, on constate qu'elle se fait en deux temps assez nettement tranchés ; très rapide dans les 10 à 15 premières minutes, elle s'arrête brusquement et ne se continue plus qu'avec une lenteur extrême.

Le ralentissement du phénomène ne peut être attribué à l'usure de la substance active, puisque l'addition de nouvelles quantités de diastase n'entraîne aucune accélération appréciable : il ne peut pas davantage être rapporté, comme le croyait Payen, à l'influence génératrice du sucre formé. La présence du maltose intervient, comme l'a montré Lindet, pour retarder la saccharification des dextrines, mais son action est tout à fait insuffisante pour expliquer l'arrêt presque complet que nous avons constaté. D'ailleurs des expériences directes ont montré que l'empois d'amidon, ajouté dans un liquide où la saccharification paraît être arrivée à son terme, est transformé sinon aussi vite, du moins aussi complètement que l'empois primitif, et que d'autre part l'addition préalable d'une quantité de maltose égale à celle qui doit se former au cours de l'opération, était sans influence notable sur la marche de celle-ci et sur le terme auquel elle s'arrête, pourvu toutefois que les solutions sur lesquelles on opère ne soient pas trop concentrées. Le facteur qui intervient surtout pour arrêter la saccharification est la résistance spéciale que présentent vis-à-vis de la diastase les dextrines résiduelles. Les partisans de la théorie du dédoublement moléculaire ont tiré leurs arguments de ces faits, et proposé, pour les expliquer, des théories dont M. Duclaux a fait, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, une critique sur laquelle je ne reviendrai pas.

Débarrassés de l'appareil des formules, les faits qu'il nous faut interpréter peuvent se résumer ainsi : Dans toute saccharification arrivée au moment où elle se ralentit au point d'être pratiquement arrêtée, il reste des dextrines ; celles-ci, si on les

isole et si on les soumet à l'action de la diastase, se montrent plus résistantes que l'empois dont elles dérivent : elles donnent, toutes choses égales d'ailleurs, d'autant moins de sucre qu'elles proviennent d'une saccharification plus avancée.

Rappelons-nous deux notions que nous avons acquises dans les chapitres précédents. Brown et Morris ont établi, et je l'ai vérifié à maintes reprises, que si on prend une quelconque des dextrines que l'on peut isoler du mélange fourni par une saccharification, il est possible de la séparer par des fractionnements à l'alcool en plusieurs portions qui, traitées simultanément et dans les mêmes conditions par la diastase, présentent des résistances très différentes; d'autre part j'ai montré que les dextrines, obtenues par l'action de la dextrinase en dehors de toute production de sucre, présentaient ce même caractère de mélanges et étaient susceptibles d'être scindées en portions de résistances différentes. L'existence de substances plus ou moins facilement attaquables est donc antérieure à la formation du sucre : il y a lieu de se demander si elle n'est pas antérieure même à la formation des dextrines, et si la raison des différences observées ne doit pas être recherchée plus haut, dans un défaut d'homogénéité de l'empois dérivant de la non homogénéité certaine du granule d'amidon : c'est ce point que nous allons tenter d'éclaircir.

On sait que lorsque des granules d'amidon non gélatinisés sont soumis à l'action de l'amylase, ils sont partiellement dissous, les uns dès la température ordinaire comme ceux de froment, les autres seulement à température plus élevée comme ceux de pomme de terre : nous allons étudier un peu en détail comment les choses se passent avec l'amidon de froment.

Pour chacune des deux expériences qui suivent, j'ai délayé 200 grammes d'amidon de froment dans 800 c. c. d'eau distillée et j'ai mis le tout au bain-marie; quand l'équilibre de température a été atteint, j'ai ajouté 200 c. c. d'extrait de malt préalablement porté à la température du bain.

A intervalles réguliers j'ai puisé 50 c. c. du mélange qu'un agitateur à palettes maintenait constamment homogène ; les 50 c. c. ainsi prélevés étaient aussitôt jetés dans 25 c. c. d'une solution à 3 p. 1000 de potasse maintenue au voisinage de 0°; la potasse arrêtait immédiatement l'action de la diastase, mais elle était en proportion trop faible et à température trop basse pour pouvoir exercer une action nuisible sur les produits dissous ; je filtrais et je dosais la quantité de matière en solution dans la prise d'essai, j'en déduisais celle qui à la même époque était dissoute dans la totalité du

liquide mis en expérience. Les nombres du tableau ci-dessous représentent les poids de matière entrée en solution, rapportés à 100 d'amidon sec traité.

Durée de la digestion en minutes.	Digestion à 55°.	Digestion à 60°.
5	26,8	44,8
10	37,1	55,2
20	41,1	61,3
40	43,0	63,2
120	44,1	64,1

La solubilisation des granules d'amidon, très rapide dans les premiers instants, se ralentit bientôt, ce ralentissement peut être rattaché à trois ordres d'influences :

- 1^o Affaiblissement de la diastase;
- 2^o Influence retardatrice des produits déjà dissous;
- 3^o Résistance de plus en plus grande des portions non dissoutes.

1^o Ce que nous savons de l'amylase ne rend guère vraisemblable l'hypothèse d'un affaiblissement de ses propriétés dans les 10 premières minutes de son action aux températures de 55° et 60°, et cette cause de retard pourrait être écartée *a priori*, il est d'ailleurs facile de constater directement qu'elle est de nulle importance.

Le liquide provenant d'une digestion faite à 55° pendant 1 heure de 20 grammes d'amidon dans 100 c. c. d'un mélange en parties égales d'eau et d'extrait de malt est filtré, puis partagé en deux portions d'égal volume. L'une, A, est portée à l'ébullition et reçoit ensuite la moitié de son volume d'extrait de malt frais; l'autre, B, reçoit la moitié de son volume d'extrait de malt bouilli. Les deux portions se trouvent ainsi dans le même état, avec cette différence que la substance encore active est en A de la diastase fraîche, en B de la diastase ayant déjà agi pendant 1 heure; dans chacun des liquides A et B je fais digérer pendant 1 heure à 55° de l'amidon de froment à raison de 20 grammes pour 100 c. c. Les quantités de matière entrées en solution, rapportées à 100 grammes d'amidon sec mis en œuvre, ont été :

Portion A.....	44,2
— B.....	44,8

Ainsi donc, le ralentissement de la solubilisation n'est pas imputable à l'usure de la diastase.

2^o La présence des produits déjà dissous a sur la marche ultérieure de l'attaque une influence des plus manifestes.

J'ai fait digérer pendant 1 heure à 55° un mélange contenant :

Eau distillée.....	120 c. c.
Extrait de malt.....	80 c. c.
Amidon de froment.....	80 grammes.

Le liquide filtré, porté à l'ébullition, refroidi, ramené au volume initial par addition d'eau distillée contient, dans 400 c. c., 16g,2 de substance dissoute provenant de l'amidon : trois flacons ont reçu :

	Eau distillée.	Liquide de la première digestion.	Extrait de malt bouilli.
Flacon a	0	100	0
— b	48	40	12
— c	80	0	20

Dans chaque flacon, j'ai ajouté en outre 20 c. c. d'extrait de malt frais, puis 20 grammes d'amidon de froment, et j'ai fait digérer pendant 1 heure à 55°; les quantités d'amidon dissous ont été :

Flacon a.....	3g,7
— b.....	5g,3
— c.....	6g,4

La seule inspection des nombres ci-dessus montre bien que si l'intervention des substances dissoutes gêne la dissolution ultérieure, elle ne suffit pas à expliquer l'arrêt brusque et presque total que nous avons observé. Celui-ci doit être rapporté, pour la plus grosse part, à la résistance de plus en plus grande qu'offrent les portions non dissoutes : l'expérience directe prouve qu'il en est bien ainsi.

100 grammes d'amidon de froment contenant 83g,1 de substance sèche ont été traités à 60° par des digestions successives de 1 h. dans un mélange contenant, pour 400 c. c. d'eau, 100 c. c. d'extrait de malt ; après chaque opération la masse était filtrée, le résidu resté sur le filtre était lavé par trois macérations de 1/4 d'heure dans 500 c. c. d'eau à 55°; les eaux de lavage étaient ajoutées au liquide de la première filtration, le tout était concentré au bain-marie, et dans la solution ainsi obtenue je dosais la substance empruntée à l'amidon ; le résidu resté sur le filtre, dont la teneur en matière sèche était évaluée par différence, était mis à digérer de nouveau dans un mélange fait de façon que les proportions relatives d'eau de diastase et d'amidon fussent les mêmes que pour la première digestion, et le mélange était traité comme la première fois ; les digestions successives étaient faites ainsi toutes de la même façon.

Les nombres du tableau ci-dessous indiquent la quantité de substance dissoute au cours de chaque digestion, ce poids est rapporté à 100 de substance sèche mise en œuvre dans la digestion correspondante :

1 ^{re} digestion.....	60,5
2 ^{re} digestion.....	37,0
3 ^{re} digestion.....	20,7
4 ^{re} digestion.....	10,0

A mesure que la quantité de matière empruntée à l'amidon devient plus considérable, les résidus deviennent de moins en moins faciles à attaquer.

Les granules qui composent l'amidon de froment sont de grosseurs différentes ; les uns gros, ovalaires, présentent des stries concentriques presque aussi nettes que celles des grains de féculé ; les autres petits, polyédriques, brillants, ont l'aspect de cristaux légèrement arrondis : si on suit sous le microscope la marche de l'attaque par la diastase, on voit les gros grains disparaître, leur partie centrale distendue fait crever les couches externes, puis se dissout, et il ne reste en fin de compte que quelques débris informes. Les grains polyédriques les plus gros sont moins rapidement et moins profondément attaqués, ils conservent leurs contours nets, à peine corrodés, mais ils sont creusés à leur partie centrale d'un cratère profond à bords déchiquetés. Quant aux grains polyédriques les plus petits, ils sont encore moins atteints, et quelques-uns semblent, même après les dernières digestions, être restés intacts, ils ont conservé leur aspect brillant. Il est manifeste que les divers granules d'un même amidon présentent vis-à-vis de la diastase des résistances très variables, et qu'il en est de même pour les différentes parties d'un même granule ; ces différences, dont la théorie de Musculus ne tient aucun compte, me paraissent présenter une importance capitale, et c'est à elles qu'il faudra rapporter toutes les particularités de la saccharification qu'on avait tenté d'expliquer par des dédoublements moléculaires.

Nous allons examiner comment se comportent, après gélatinisation, les résidus que nous avons appris à préparer en poussant plus ou moins loin la dissolution des granules par la diastase.

J'ai traité de la même façon, à 60°, après gélatinisation dans des conditions identiques, d'une part de l'amidon de froment, d'autre part les résidus obtenus en dissolvant des proportions plus ou moins considérables de ce même amidon : le résidu A qui a servi aux expériences suivantes représentait 9,5 0/0 de l'amidon primitif.

I. Deux empois à 3 p. 100 d'amidon, faits à 90°, traités simultanément à 60° par la même quantité de diastase, ont donné :

Poids de subst. entrée en solution pour 100 d'amidon
gélatinisé.

Amidon entier.....	92,4
Résidu A.....	70,2

II. Deux empois à 30/0 ont été faits et saccharifiés dans les conditions de l'expérience précédente. Les nombres du tableau ci-dessous indiquent la proportion de sucre formée, rapportée à 100 de matière dissoute :

Temps en minutes.	Amidon entier.	Résidu A.
5	43,6	15,0
10	67,3	21,2
20	78,0	33,7
40	80,1	42,1
60	80,2	43,0
120	80,9	43,0

L'empois fait avec l'amidon résiduel se saccharifie moins vite et donne en définitive moins de maltose que l'empois fait avec l'amidon entier. L'expérience suivante a été faite avec de l'amidon de pomme de terre.

Le résidu obtenu par des traitements successifs de la féculle par la diastase à 55° représentait 20,2 0/0 de l'amidon primitif : la saccharification faite à 60° des deux empois préparés à 80° a donné :

Maltose p. 100 de matière dissoute.

Amidon entier.....	79,3
Amidon résiduel.....	60,2

Ces expériences prouvent que les portions de l'amidon les plus difficiles à dissoudre donnent, après gélatinisation, les empois les plus difficiles à saccharifier, mais les indications qu'elles fournissent doivent être complétées. Un empois fait avec de l'amidon de froment, traité par la diastase à 60°, donne un liquide qui contient, pour 100 grammes de matière dissoute, environ 80 grammes de maltose et 20 grammes de dextrine, c'est donc le cinquième de la substance amylose qui est resté à l'état de dextrine ; en saccharifiant un empois fait avec de l'amidon résiduel qui représentait seulement 9,5 0/0 de l'amidon primitif, nous avons obtenu 43 0/0 de maltose : nous ne pouvons donc pas admettre d'emblée que les dextrines qui restent non transformées dans le cas de l'amidon complet sont précisément celles qui correspondent aux portions les plus résistantes du granule, car autrement le résidu A des expériences précédentes n'aurait pas dû donner de maltose. L'attaque de l'amidon non gélatinisé est irrégulière, comme en témoignent les bords déchiquetés du granule et du cratère central, les couches d'inégale

résistance sont certainement un peu entremêlées, et il est possible que des portions peu résistantes échappent à l'action de la diastase par suite de leur position, enclavées qu'elles sont dans des couches plus résistantes qui restent indissoutes et qui les protègent.

Toutefois il ne me paraît pas qu'il faille chercher de ce côté l'explication que nous cherchons, nous allons la trouver en regardant du côté de la gélatinisation.

En suivant sous le microscope la gélatinisation des granules d'amidon délayés dans l'eau et chauffés progressivement, on constate que les portions internes se gonflent d'abord; elles font éclater les couches externes, font hernie, puis disparaissent dans le liquide, en sorte que les portions externes, celles qui sont le plus fortement agrégées, se trouvent, au moment où elles se gélatinisent à leur tour, en présence non pas d'eau pure, mais d'un véritable empois; or, dans ce cas, la gélatinisation est imparfaite et donne un empois difficile à saccharifier.

J'ai préparé deux mélanges constitués de la façon suivante: 1^o mélange A, j'ai ajouté 50 c. c. d'un empois à 30/0 d'amidon de froment à 50 c. c. d'un autre empois contenant 3 0/0 d'un résidu qui représentait 9,8 0/0 du même amidon; 2^o mélange B, 1,5 d'amidon de froment ont été gélatinisés dans 400 c. c. d'eau; l'empois étant maintenu à 90°, j'y ai ajouté 1,5 de l'amidon résiduel qui se trouve ainsi gélatinisé non dans l'eau mais dans un empois à 4,5 0/0. J'ai saccharifié dans les mêmes conditions à 60°, les mélanges A et B, un empois à 3 0/0 fait avec l'amidon entier, et un empois à 3 0/0 fait avec l'amidon résiduel. Les quantités de sucre formées, rapportées à 100 de matière totale, ont été :

Pour l'empois fait avec l'amidon entier	76,2
Pour l'empois fait avec l'amidon résiduel.....	40,3
Pour le mélange A.....	57,8
Pour le mélange B.....	39,6

Des nombres précédents il ressort que dans le mélange A les deux empois se sont transformés sans exercer d'influence l'un sur l'autre; au contraire, dans le mélange B tout se passe comme si l'amidon résiduel était resté tout entier à l'état de dextrine; d'autres expériences, faites dans les mêmes conditions, ont donné des résultats identiques, et établissent bien que les dextrines les plus difficiles à transformer en maltose, celles qui persistent le plus longtemps dans le liquide en voie de saccharification, proviennent des portions les plus cohérentes de l'amidon.

Comme contre-partie de ce que nous venons de voir, nous

devons trouver que les portions les plus facilement solubilisables de l'amidon sont aussi celles qui donnent le plus facilement du sucre.

I. 100 grammes d'amidon de froment ont été traités à 55° par 400 c. c. d'eau additionnés de 100 c. c. d'extrait de malt; au bout de 10 minutes, le mélange a été refroidi, filtré; le liquide filtré contenait dans 100 c. c. 6g,4 de matière dissoute; il a été remis au bain-marie à 60° où l'action de la diastase s'est poursuivie sur la matière amylose entrée en solution; quand l'action a été terminée, j'ai trouvé que la substance empruntée à l'amidon renfermait :

Maltose.....	96,2
Dextrine.....	3,8

L'empois fait avec l'amidon total et contenant environ 6 0/0 de matière solide traité dans les mêmes conditions par la diastase à 55° et à 60° a donné :

Maltose.....	70,2
Dextrine.....	29,8

II. Cette expérience a été faite de la même façon que la précédente; mais, avec de l'amidon de pomme de terre, elle a donné :

Substance dissoute au cours de la première digestion, rapportée à 100 d'amidon sec.....	20g,4
Substance dissoute dans 100 c. c. de liquide pendant la saccharification.....	4,6
Maltose p. 100 de substance dissoute, quand la saccharification est finie.....	98,2
Dextrine.....	4,8

Un empois à 4 0/0 de féculle saccharifiée dans les mêmes conditions a donné :

Maltose.....	80,4
Dextrine.....	17,9

La conclusion qui se dégage de tout ce que nous avons appris au cours de ce chapitre est que le granule d'amidon qui constitue une masse hétérogène au point de vue physique, reste hétérogène après gélatinisation; les portions les moins cohérentes donnent un empois qui se dextrinise et se saccharifie vite; les portions les plus cohérentes donnent un empois qui se dextrinise et se saccharifie lentement, elles fournissent les dextrines résiduelles qui restent non pas inattaquables, mais difficilement attaquables dans toute saccharification arrivée à son terme.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.